

**Untersuchung des nasalen Mikrobioms bei  
gesunden Katzen, Katzen mit Katzenschnupfen  
und Katzen mit Nasentumoren**

von Elisabeth Sieglinde Dorn

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde  
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität  
München

**Untersuchung des nasalen Mikrobioms bei  
gesunden Katzen, Katzen mit Katzenschnupfen  
und Katzen mit Nasentumoren**

von Elisabeth Sieglinde Dorn  
aus Nürnberg

München 2018

Aus dem Zentrum für Klinische Tiermedizin der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Medizinische Kleintierklinik

Arbeit angefertigt unter der Leitung von:

Priv.-Doz. Dr. Bianka Schulz

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph.D

Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. Bianka Schulz

Korreferent: Priv.-Doz. Dr. Nadja Herbach

Tag der Promotion: 10. Februar 2018

Meinen Eltern  
und  
den Generationen von Lindenhofkatzen

## INHALTSVERZEICHNIS

<b>I.</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>II.</b>	<b>LITERATURÜBERSICHT .....</b>	<b>3</b>
<b>1.</b>	<b>Mikrobiom .....</b>	<b>3</b>
1.1.	Definition der Mikrobiota .....	3
1.2.	Definition des Mikrobioms .....	3
1.3.	Definition des Metagenoms .....	3
1.4.	Bedeutung des Mikrobioms .....	4
1.4.1.	Konkurrenz der Bakterien .....	5
1.4.2.	Beeinflussung der Physiologie durch Bakterien .....	5
1.4.3.	Interaktionen von Bakterien .....	6
<b>2.</b>	<b>Humanes Mikrobiom des oberen Respirationstrakts .....</b>	<b>8</b>
2.1.	Physiologische Veränderungen .....	8
2.1.1.	Altersabhängigkeit .....	8
2.1.2.	Einfluss von Stillen .....	10
2.1.3.	Einfluss von Jahreszeiten .....	10
2.2.	Pathologische Veränderungen .....	11
2.2.1.	Virusinfektionen .....	11
2.2.2.	Chronische Rhinosinusitis .....	12
2.2.3.	Allergische Rhinitis .....	15
2.2.4.	<i>Otitis media</i> .....	15
2.2.5.	Pneumonie .....	17
2.3.	Einfluss von prophylaktischen und therapeutischen Maßnahmen .....	17
2.3.1.	Einfluss von Impfungen .....	17
2.3.2.	Einfluss von Antibiotika .....	18
2.3.3.	Einfluss von Kortikosteroiden .....	20
2.3.4.	Einfluss von Probiotika .....	20
2.3.5.	Einfluss von Präbiotika .....	22
<b>3.</b>	<b>Felines Mikrobiom des oberen Respirationstrakts .....</b>	<b>24</b>
3.1.	Physiologisches Bakterienvorkommen .....	24
3.2.	Pathologische Veränderungen .....	24
3.2.1.	Nasale Neoplasien .....	24
3.2.2.	Rhinitis .....	24

---

3.2.3.	Katzenschnupfen .....	25
<b>4.</b>	<b>Nachweisverfahren zur Detektion von Bakterien im oberen Respirationstrakt.....</b>	<b>27</b>
4.1.	Kulturelle Methoden .....	27
4.2.	Molekularbiologische Methoden .....	28
4.2.1.	Polymerasekettenreaktion (PCR) .....	28
4.2.2.	Genomsequenzierung .....	31
4.2.2.1.	16S-rRNA-Amplikon-Sequenzierung .....	31
4.2.2.2.	Metagenom-Shotgun-Sequenzierung .....	33
<b>III.</b>	<b>VERÖFFENTLICHUNG .....</b>	<b>35</b>
<b>IV.</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>77</b>
<b>V.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>89</b>
<b>VI.</b>	<b>SUMMARY .....</b>	<b>90</b>
<b>VII.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>91</b>
<b>VIII.</b>	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>123</b>

**ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

16S-rRNA	16S-ribosomale Ribonukleinsäure
ANOSIM	Analysis of similarities
<i>B. bronchiseptica</i>	<i>Bordetella bronchiseptica</i>
<i>C. felis</i>	<i>Chlamydia felis</i>
CRS	Chronische Rhinosinusitis
CT	Computertomographie
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Dr.	Doktor
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
et al.	et alii/ aliae
FCV	Felines Calicivirus
FHV-1	Felines Herpesvirus
<i>fla</i> A-Gen	Flagellin-Strukturgen
FURTD	Feline upper respiratory tract disease
<i>H. influenzae</i>	<i>Haemophilus influenzae</i>
H1N1	Hämagglutinin des Subtyps 1, Neuraminidase des Subtyps 1
IgE	Immunglobulin E
IL	Interleukin
LEfSe	linear discriminant analysis effect size
<i>M. catarrhalis</i>	<i>Mycoplasma catarrhalis</i>
MRSA	Methicillin-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
NGS	Next-Generation-Sequencing
OTU	Operational Taxonomic Unit
<i>P. acnes</i>	<i>Propionibacterium acnes</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
PCV7	Pneumococcal conjugate vaccine 7
Prof.	Professor
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>S. epidermidis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
<i>S. pneumoniae</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
sp.	Spezies
spp.	Spezies pluralis
Th-1	T-Helferzelle vom Typ-1
UniFrac	unique fraction Metrik
WHO	Weltgesundheitsorganisation



## I. EINLEITUNG

Der Begriff „Mikrobiom“ wurde 2001 von Joshua Lederberg geprägt und bezeichnet die Gesamtheit der mikrobiellen Taxa, die ein Habitat besiedeln (LEDERBERG & MCCRAY, 2001). In den letzten Jahren gewann dieses Thema stark an Bedeutung und weckte großes Forschungsinteresse. Zahlreiche Studien beschäftigen sich aus unterschiedlichen Blickwinkeln mit der Veränderung des Mikrobioms eines jeweiligen Organsystems und möglichen gesundheitlichen Folgen. Die Rolle von Bakterien bei der Entstehung und Aufrechterhaltung respiratorischer Erkrankungen der Katze ist derweil noch weitgehend ungeklärt.

Traditionell wurden mikrobielle Untersuchungen im felines Respirationstrakt mittels kulturellem Nachweis durchgeführt. So wurden insbesondere im Zusammenhang mit dem Katzenschnupfenkomplex bestimmte Bakterien als Primär-, andere als Sekundärerreger identifiziert. Untersuchungen zum Bakterienvorkommen bei gesunden Katzen oder Katzen mit nasalen Neoplasien lagen dagegen kaum vor. Die in der Mikrobiomforschung angewandte Genomsequenzierung ermöglicht es, ein Bakterienvorkommen zu identifizieren, welches mit herkömmlichen Methoden nicht nachweisbar ist. Ziel der Mikrobiomforschung liegt darin, ein Core-Mikrobiom in bestimmten Organsystemen zu identifizieren und nachfolgend diagnostische Tests zu etablieren, die Veränderungen des Mikrobioms bei Krankheiten detektieren (VAZQUEZ-BAEZA et al., 2016). Außerdem ermöglichen die Kenntnisse über das veränderte Mikrobiom bei unterschiedlichen Krankheiten, spezifisch auf das bakterielle Ungleichgewicht einzuwirken und somit eine differenzierte und an die Situation angepasste Therapie durchzuführen (SMITS et al., 2013). Man geht davon aus, dass zukünftig vielversprechende Behandlungsansätze unter Zuhilfenahme von Bakterien, die die kommensalen Mikroorganismen unterstützen, durchgeführt werden können. Gleichzeitig würde ein verminderter Einsatz von Antibiotika bei erhöhtem Gebrauch von Probiotika der alarmierenden Resistenzlage vieler Bakterien entgegenwirken und Nebenwirkungen reduzieren (LEMON et al., 2012).

Ziel dieser Arbeit war, das Nasenmikrobiom von gesunden Katzen, Katzen mit Katzenschnupfen und Katzen mit Nasentumoren mittels 16S-rRNA-Amplikon-Sequenzierung zu beschreiben. Des Weiteren sollte die Frage geklärt werden, ob

---

das Mikrobiom der Nase bei gesunden Katzen von individuellen Faktoren und Umwelteinflüssen beeinflusst wird.

## II. LITERATURÜBERSICHT

### 1. Mikrobiom

Der Begriff „Mikrobiom“ leitet sich von den altgriechischen Worten „mikrós“ für „klein“ und „bíos“ für „Leben“ ab (BANAY, 1948). 2001 prägte der Nobelpreisträger und US-Molekularbiologe Joshua Lederberg die Begriffe „Mikrobiota“ und „Mikrobiom“ (LEDERBERG & MCCRAY, 2001).

#### 1.1. Definition der Mikrobiota

Lederberg definierte Mikrobiota als eine mikrobielle Systematik (LEDERBERG & MCCRAY, 2001). Auch JOHNSON und VERSALOVIC (2012) bezeichneten Mikrobiota als eine mikrobielle Gemeinschaft. Laut der Definition von HASEGAWA und CAMARGO (2015) sind Mikrobiota alle in einer bestimmten Nische oder Region auffindbaren Mikroben. URSELL et al. (2012) wiederum beschrieben Mikrobiota als alle mikrobiellen Taxa, die dem Menschen zugeordnet werden.

#### 1.2. Definition des Mikrobioms

Das Mikrobiom stellt ein Spektrum an Symbionten (gleichsam nützlich für Mikroben und Wirt) (PERRET et al., 2000), Kommensalen (neutral für Mikroben und Wirt) und Pathogenen (schädigend für den Wirt) dar (STEINERT et al., 2000). LEDERBERG charakterisierte das Mikrobiom als den Katalog dieser kommensalen, symbiotischen und pathogenen Mikroben und ihrer Gene (LEDERBERG & MCCRAY, 2001). Diese Definition wurde erweitert um die Gemeinschaft der Gene und Genprodukte von Mikroben, die in und auf Menschen leben (JOHNSON & VERSALOVIC, 2012). HASEGAWA und CAMARGO (2015) führten in ihrer Definition als Beispiele für Mikroben Bakterien, Archaeen, Pilze und Viren im menschlichen Körper an.

#### 1.3. Definition des Metagenoms

Bezugnehmend auf das Humangenomprojekt vertrat Lederberg die These, dass eine umfassende genetische Beurteilung des Menschen nur möglich sei, wenn hierbei auch die Gene des Mikrobioms eingeschlossen wären (LEDERBERG & MCCRAY, 2001). Diese Gesamtheit der genomischen Information wird durch das

Metagenom beschrieben, das aus einer komplexen mikrobiellen Gemeinschaft und der humanen Desoxyribonukleinsäure (DNA) besteht (JOHNSON & VERSALOVIC, 2012; SEGATA et al., 2013).

#### 1.4. Bedeutung des Mikrobioms

Im Hinblick auf die Allgegenwärtigkeit von Bakterien machten KIL und SWANSON (2011) die Aussage:

*„Whether in an ocean reef, a landfill, or a gastrointestinal tract (GIT), invisible communities of highly active and adaptable microbes prosper.“*

Bereits 1998 wurde vermutet, dass die Anzahl der Prokaryoten, die den Körper von Tieren besiedeln, enorm, jedoch im Vergleich zur Gesamtheit der auf der Erde vorkommenden Prokaryoten verschwindend gering ist (WHITMAN et al., 1998). Sowohl der Körper von Menschen als auch der von Tieren wird von vielen verschiedenen Bakterienspezies besiedelt (LI et al., 2012). SAVAGE (1977) postulierte, dass gemessen an der Gesamtzahl an Zellen eines Menschen, nur 10 % der Zellen wirtseigen sind. Mittlerweile geht man davon aus, dass allein die Anzahl der im Gastrointestinaltrakt beheimateten kommensalen Mikroben die Anzahl an körpereigenen Zellen um ein Zehnfaches übertrifft (KIL & SWANSON, 2011). Die menschliche mikrobielle Flora besteht demnach aus 10–100 Trillionen symbiotischen mikrobiellen Zellen, insbesondere aus Darmbakterien. Das humane Mikrobiom wiederum setzt sich aus den Genen dieser Zellen zusammen (TURNBAUGH et al., 2007). Allein das Mikrobiom des Darms enthält 150-mal mehr genetische Information als der Mensch an sich (QIN et al., 2010). Das Mikrobiom unterscheidet sich individuell (KASPAR et al., 2016) und variiert je nach Körperlokalisation (COSTELLO et al., 2009; HUMAN MICROBIOME PROJECT CONSORTIUM, 2012). Die meisten Interaktionen zwischen dem Menschen und Mikroorganismen resultieren nicht in einer Erkrankung (DETHLEFSEN et al., 2007) - die Mikroorganismen leben in der Regel unter physiologischen Umständen in einer symbiotischen Beziehung mit ihrem Wirt (GRICE & SEGRE, 2012). So unterstützt das Mikrobiom die Stimulation, Ausbildung und Regulation des Immunsystems (CASH et al., 2006). Es beeinflusst die Schleimhaut- und Hautstruktur und ist an der Vorbeugung einer Kolonisation mit potentiell pathogenen Mikroorganismen (WANKE et al., 2011) und der Widerstandsfähigkeit gegenüber Infektionen (THERIOT & YOUNG, 2014)

beteiligt.

#### 1.4.1. Konkurrenz der Bakterien

Der Konkurrenzkampf um Körperrischen bewirkt einen Selektionsdruck. So korreliert das Vorhandensein einer bestimmten Spezies negativ mit dem Vorkommen einer anderen Spezies (FAUST et al., 2012). Erklärungsversuche hierfür lieferte die Genomanalyse des menschlichen Mikrobioms. Damit konnten mehrere Gen-Cluster ausfindig gemacht werden, die für Enzyme kodieren, welche mit der Produktion von Antibiotika assoziiert sind. Darauf basierend konnte beispielsweise gezeigt werden, dass *Enterococcus faecalis* im Gastrointestinaltrakt von Mäusen antimikrobiell wirksames Bacteriocin produziert, welches den Wettbewerb um die bakterielle Besiedlung des Darmes beeinflusst (KOMMINENI et al., 2015). Die unterschiedliche Konzentration und Variation von Bacteriocin ist abhängig von der jeweiligen Körperrische und führt zu einer stark differierenden mikrobiellen Besiedlung der einzelnen Körperhabitate (ZHENG et al., 2015). In einer *In-vitro*-Studie konnte belegt werden, dass *Streptococcus mutans* antimikrobiell wirksames Lantibiotikum produziert, welches das Wachstum anderer Streptokokken und weiterer grampositiver Mikroorganismen hemmt (CHIKINDAS et al., 1995). Lactocillin, ein neues zu den Thiopeptiden zählendes Antibiotikum, wurde bei Kommensalen der humanen Vagina nachgewiesen. Es hat das Potential, antibakteriell gegen Pathogene, die dieses Habitat besiedeln könnten, zu wirken (DONIA et al., 2014). *Staphylococcus lugdunensis*, ein Kommensale der menschlichen Nase, produziert Lugdunin, welches zu den neuartigen zyklischen Peptidantibiotika gehört, die Thiazolidin enthalten. Aufgrund dessen vermindert die Kolonisation der Nase mit diesem Bakterium eine gleichzeitige Besiedlung mit dem potentiellen Pathogen *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) (ZIPPERER et al., 2016).

#### 1.4.2. Beeinflussung der Physiologie durch Bakterien

Insbesondere die Funktion von gastrointestinalen Mikrobiota wurde in den letzten Jahren intensiv erforscht. Neben ihrer Beteiligung an der Nährstoffverdauung (FLINT et al., 2012) und bei Immunfunktionen (MACPHERSON et al., 2000), erfüllen sie eine wichtige Rolle bei metabolischen Funktionen (QIN et al., 2010) und beeinflussen den Metabolismus und die Toxizität von Medikamenten (CLAYTON et al., 2006). Das Mikrobiom reguliert außerdem Stoffwechselprozesse im Körper, wie beispielsweise den Fettstoffwechsel im

Darm. Im Mäuseversuch konnte festgestellt werden, dass keimfrei aufgezogene Mäuse, denen das Mikrobiom des Darmes normaler Mäuse instilliert wurde, innerhalb von 14 Tagen an Körperfett zunahmen und insulinresistent wurden - dabei nahmen sie jedoch weniger Futter zu sich als die Vergleichsmäuse, die von Geburt an ihr natürliches Darmmikrobiom hatten (BACKHED et al., 2004). Somit ist das Mikrobiom als metabolisch eigenes Organ anzusehen, welches die Physiologie und den Phänotyp des Wirts potentiell beeinflusst (KIL & SWANSON, 2011).

#### **1.4.3. Interaktionen von Bakterien**

Aufzeichnungen, die auf Vorlesungen des New York Veterinary College der 1920er Jahre basieren, zeugen von dem bereits damals vorhandenen Wissen, dass viele Infektionserkrankungen auf mehreren Erregern beruhen (TIMONEY et al., 1988). Die Entstehung von Infektionserkrankungen kann durch Mikroorganismen auf verschiedene Arten herbeigeführt werden: Einige pathogene Organismen potenzieren die Effekte anderer Pathogene. Als Beispiel sind hier virale Infektionen, auf die Sekundärinfektionen mit Bakterien folgen, anzuführen. Wieder andere Mikroorganismen können nur in Kombination mit anderen ernsthafte Erkrankungen auslösen (BAKALETZ, 2004). Generell stellt die Besiedelung mit Kommensalen einen der bedeutendsten Schutzmechanismen gegenüber Infektionen mit Pathogenen dar (SMITH, 1982). Daneben sind kommensale Mikrobiota jedoch auch Reservoir für Pathogene und Träger von Antibiotikaresistenzen (HU et al., 2013; LIU et al., 2013b) oder Virulenzgenen (GARCIA-RODRIGUEZ & FRESNADILLO MARTINEZ, 2002). Kommt es zu Imbalancen des Mikrobioms, kann dies zu Erkrankungen des Wirts führen (CHARLSON et al., 2011). In diesem Zusammenhang wurden lange Perioden asymptomatischer Besiedlung des oberen Respirationstrakts mit potentiellen Pathogenen (GARCIA-RODRIGUEZ & FRESNADILLO MARTINEZ, 2002), aber auch invasive Erkrankungen durch normalerweise harmlose Kommensalen beschrieben (BAKALETZ, 2004). Diese Erkenntnisse erschweren die Definition von Kommensalen des Respirationstrakts. Stattdessen ist es sehr wahrscheinlich, dass jede Körperregion Mikrobiota beheimatet, die durch die jeweilige Körperlokalisation (BLASER & FALKOW, 2009), Störung der bakteriellen Gemeinschaft, Umwelteinflüsse (FELDMAN & ANDERSON, 2013) und Immunantwort des Wirts (STARKEY et al., 2013) beeinflusst werden. Es kann darüber hinaus zu Veränderungen des Mikrobioms

kommen, wenn primäre Prozesse wie Tumorerkrankungen (ROBINSON et al., 2017), virale Infektionen (ALLEN et al., 2014) oder chronisch entzündliche Prozesse (JERVIS BARDY & PSALTIS, 2016) vorliegen, die eine Störung der lokalen Schleimhautintegrität (KIM et al., 2015) und der natürlichen Schutzmechanismen des Körpers (ZARIWALA et al., 2007) bewirken.

Die Rolle von Bakterien in der Nase wurde auch beim Menschen bisher nicht vollständig erforscht, was auch mit der Schwierigkeit ihrer Einordnung in Kommensalen und Pathogene zusammenhängt. Weltweit haben es sich Mikrobiomprojekte zur Aufgabe gemacht, unter anderem im Respirationstrakt die Rolle dieser Symbionten zu erforschen und ihr Mitwirken an der menschlichen Gesundheit zu evaluieren (PETERSON et al., 2009).

## **2. Humanes Mikrobiom des oberen Respirationstrakts**

Das nasale Mikrobiom des Menschen hat im Gegensatz zu dem von Katzen in den letzten Jahren große Beachtung gefunden. Auf beim Menschen untersuchte Faktoren und Krankheiten, welche auch bei Katzen eine Rolle spielen könnten, wird im Rahmen dieses Kapitels genauer eingegangen.

Die Nase filtert (LIPPMANN et al., 1980), erwärmt und befeuchtet (GEURKINK, 1983) täglich über 10.000 Liter Luft, bevor diese die Lunge erreichen (REYNOLDS, 1991). Im Respirationstrakt stellt sie auch die erste Lokalisation dar, die mit der Umwelt in Form von Partikeln, Mikroorganismen und Allergenen in Kontakt tritt. Konsequenterweise resultiert hieraus, dass sie ein hochgradig entwickeltes angeborenes und erworbenes Immunsystem beherbergt (SCADDING et al., 2011). Aufgrund ihrer exponierten Lokalisation wird davon ausgegangen, dass die Nase zusätzlich zu ihren eigenen Bakterien aus der Umwelt stammende Mikroben beheimatet (BIRZELE et al., 2017). Die mittels Sequenzierung am häufigsten nachgewiesenen Stämme in der menschlichen Nase sind Actinobacteria, Firmicutes und Proteobacteria (BASSIS et al., 2014). Bereits im Jahr 2000 konnte gezeigt werden, dass das nasale Mikrobiom sich vom Mikrobiom des Pharynx unterscheidet (RASMUSSEN et al., 2000). Darüber hinaus unterscheidet es sich auch vom oralen Mikrobiom, und es gibt auch nur geringe Übereinstimmungen mit dem Mikrobiom der Lunge bei gesunden Individuen (BASSIS et al., 2015). Das nasale Mikrobiom des Menschen ist sehr vielfältig und variiert stark zwischen einzelnen Individuen (RASMUSSEN et al., 2000; BOGAERT et al., 2011; ALLEN et al., 2014), vergleichbar mit einem Fingerabdruck (KASPAR et al., 2016).

### **2.1. Physiologische Veränderungen**

Mikrobielle Gemeinschaften unterscheiden sich in Qualität und Quantität. Beeinflusst werden sie von physikalisch-chemischen Umwelteinflüssen und physikalischen und metabolischen Veränderungen, die durch den Wirt hervorgerufen werden (VON WINTZINGERODE et al., 1997).

#### **2.1.1. Altersabhängigkeit**

Die mikrobielle Besiedlung des oberen Respirationstrakts beginnt direkt nach der Geburt. Dabei sammeln sich zunehmend verschiedene Bakterienspezies an, die sich nach und nach zu einer komplexen und dynamischen mikrobiellen Flora entwickeln. Ab einem Alter von etwa eineinhalb Monaten können unterschiedliche



Ausprägungen des Mikrobioms im Respirationstrakt von gesunden Kindern festgestellt werden. Schon diese ersten Mikrobiomprofile korrelieren mit der Stabilität und auch der Veränderung des Mikrobioms im Laufe der Zeit. Kleinkinder, in deren nasaler mikrobieller Zusammensetzung die Taxa *Moraxella*, *Corynebakterium* und *Dolosigranulum* vorherrschend waren, wiesen in den ersten zwei Lebensjahren ein stabileres Mikrobiom und weniger Infektionen des Respirationstraktes auf als Kinder, bei denen diese Bakterien seltener nachzuweisen waren. Hingegen war das Vorherrschen der Taxa *Haemophilus* und *Streptococcus* mit einem weniger stabilen Mikrobiom assoziiert (BIESBROEK et al., 2014a). Vor allem während des ersten Lebensjahres verändert sich das nasale Mikrobiom deutlich, bleibt dabei aber stets individuell. In diesem Zeitraum nimmt die Dichte an Bakterien im oberen Atmungstrakt exponentiell zu. Die auf Operational Taxonomic Units (OTUs), der Zusammenfassung ähnlicher Sequenzen von vermutlich ähnlichen Bakterien zu einer taxonomischen Einheit (SCHLOSS et al., 2009), basierende Vielfalt des Mikrobioms nimmt insgesamt hingegen exponentiell ab (MIKA et al., 2015). STEARNS und Mitarbeiter (2015) stellten ebenfalls fest, dass sich die nasopharyngealen Mikrobiota im unreifen Zustand des Kindesalters von denen adulter Individuen unterscheiden. Allerdings beobachteten sie, dass der juvenile Nasopharynx von einigen wenigen Taxa, insbesondere von *Moraxella* dominiert wird und im Erwachsenenalter eine höhere Diversität aufweist. Auch PETERSON und Mitarbeiter (2016) beschrieben in einer Längsschnittstudie, dass das Mikrobiom von Kindern im ersten Lebensjahr an Diversität zunimmt. Bei der Betrachtung der häufigsten OTUs wiesen diese Kinder andere Taxa auf als ihre Betreuungspersonen. Während der Ausreifung des Mikrobioms, die vermutlich während der ersten Lebensjahre stattfindet, sind Kinder besonders anfällig für Erkrankungen des Respirationstrakts (STEARNS et al., 2015).

Nicht nur bei Kindern, sondern auch bei Erwachsenen besteht ein altersabhängiger Unterschied des Mikrobioms. Das Nasenmikrobiom von Bewohnern eines Altenheims im Alter ab 65 Jahren unterschied sich demnach signifikant von dem 18- bis 40-jähriger Probanden hinsichtlich der mikrobiellen Populationen und glich sich mit zunehmendem Alter dem Mikrobiom des Oropharynx an (WHELAN et al., 2014). Zu einem Ergebnis, das dem bisherigen Forschungsstand widerspricht, kamen HILTY und Mitarbeiter (2012). Die Forschergruppe konnte bei der Untersuchung des nasalen Mikrobioms von Kindern unter zwei Jahren mit *Otitis*

*media* im Vergleich zu gesunden Kontrollpatienten keine Altersabhängigkeit in Bezug auf die Zusammensetzung des Mikrobioms feststellen. Als Erklärung für dieses Phänomen wird von einer sehr engen Altersspanne ausgegangen.

### **2.1.2. Einfluss von Stillen**

Neben der Altersabhängigkeit scheint auch die Ernährung in den ersten Lebensmonaten eine Rolle bei der Ausbildung des Mikrobioms zu spielen: Das nasale Mikrobiom wies bei Kleinkindern, die als Baby gestillt worden waren, eine höhere Stabilität auf (BIESBROEK et al., 2014a). Auch zeigte das Mikrobiom im Nasopharynx von sechs Wochen alten Säuglingen, die ausschließlich gestillt wurden, deutliche Unterschiede zu dem von gleichalten Kindern, die nur fertige Babynahrung erhielten. Die vorherrschenden Taxa bei gestillten Kindern waren demnach *Dolosigranulum* und *Corynebacterium*. *Dolosigranulum* korrelierte in diesem Zusammenhang negativ mit der Ausbildung milder respiratorischer Symptome. Im Alter von sechs Monaten war dieser Einfluss nicht mehr nachweisbar. Möglicherweise könnte diese Beeinflussung des Mikrobioms Teil des natürlichen Schutzmechanismus gegen Erkrankungen des Respirationstraktes sein (BIESBROEK et al., 2014b). Einige Mikroorganismen im Nasopharynx von Kleinkindern scheinen an der Ausbildung des immunologischen Gedächtnisses beteiligt zu sein und Einfluss auf immunologische Reaktionen auszuüben, die teilweise lebenslang bestehen bleiben (MIZGERD, 2014).

### **2.1.3. Einfluss von Jahreszeiten**

Das Mikrobiom im Nasopharynx von Kindern ändert sich in seiner Zusammensetzung jahreszeitenabhängig. Im Vergleich waren in Frühling und Winter die Stämme Proteobacteria und Fusobacteria häufiger repräsentiert, wohingegen Bacteroidetes und Firmicutes in den Sommermonaten häufiger detektiert wurden. Diese saisonalen Veränderungen scheinen hierbei unabhängig von einer kürzlich erfolgten antibiotischen Vorbehandlung oder einer viralen Coinfektion zu sein. Auch die Unterbringung der Probanden in Kindertagesstätten oder Zigarettenrauch in der unmittelbaren Umgebung der Kinder hatten keinen Einfluss auf eine signifikante jahreszeitenabhängige Änderung des nasopharyngealen Mikrobioms. Obwohl eine Beeinflussung des Mikrobioms durch jahreszeitlich bedingt auftretende Viren nicht gänzlich ausgeschlossen werden konnte, wies die Arbeitsgruppe darauf hin, dass bei nachfolgenden Untersuchungen

der Zeitpunkt der Probensammlung berücksichtigt werden sollte (BOGAERT et al., 2011). Auch MIKA und Mitarbeiter (2015) verwiesen neben dem Stellenwert des Alters auf den Einfluss der Jahreszeiten. In ihrer Studie unterschieden sich sowohl die Menge als auch die Zusammensetzung der nasalen Bakterien in den Sommer- und Wintermonaten. Es konnte jedoch kein saisonaler Einfluss auf die Dichte der Bakterien verzeichnet werden. Eine kanadische Studie berichtete unter Berücksichtigung des Vorkommens von potentiellen Pathogenen in der Nase von vier bis sechs Monate alten Kindern von einer Abnahme der relativen Häufigkeit von *S. aureus* bei gleichzeitiger Zunahme von *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*) während der Sommermonate (PETERSON et al., 2016).

## 2.2. Pathologische Veränderungen

Durch Erkrankungen hervorgerufene Variationen des humanen nasalen Mikrobioms waren in den letzten Jahren Gegenstand diverser Studien, die nachfolgend aufgeführt werden.

### 2.2.1. Virusinfektionen

Das nasale Mikrobiom jedes Einzelnen ändert sich im Verlauf einer Infektion mit Rhinoviren. Hierbei ist jedoch die Variabilität der Bakterien zwischen einzelnen Personen größer als die innerhalb eines Individuums (ALLEN et al., 2014). Auch im Rahmen einer Längsschnittstudie an Kleinkindern wurde das nasale Mikrobiom im Hinblick auf die Veränderung während einer Rhinovirusinfektion untersucht. Im Gegensatz zu der asymptomatischen Besiedlung des Respirationstrakts mit dem humanen Rhinovirus war die symptomatische Rhinovirusinfektion mit einer geringeren Alpha-Diversität assoziiert. Die Alpha-Diversität ist ein Maß für die Diversität innerhalb einer Probe und definiert durch die Anzahl, Diversität, Verteilung und Abundanz der nachgewiesenen Bakterienspezies (LEMON et al., 2012). Gleichzeitig war die symptomatische Infektion mit einer höheren Konzentration an Bakterien und Unterschieden in der Beta-Diversität gekennzeichnet. Die Beta-Diversität stellt in der Mikrobiomforschung ein Maß für die unterschiedliche bakterielle Zusammensetzung hinsichtlich der Artenvielfalt zwischen verschiedenen Proben dar (LEMON et al., 2012). Bezeichnenderweise wiesen Kinder, die häufiger an Rhinovirusinfektionen litten, nach einem Jahr ein weniger diverses Mikrobiom auf als noch zu Beginn der Studie (KORTEN et al., 2016).

### 2.2.2. Chronische Rhinosinusitis

Chronische Rhinosinusitis (CRS) ist eine chronisch entzündliche Funktionsstörung der Nase sowie der Nasennebenhöhlen, bei der Bakterien eine Rolle spielen können. Die Bezeichnung „chronisch“ ist hierbei definiert durch das Anhalten der Symptome über einen Zeitraum von mehr als 12 Wochen ohne vollständiges Abklingen der Symptomatik (FOKKENS et al., 2012).

Die Ätiologie der CRS ist größtenteils noch unbekannt, jedoch scheint sie multifaktoriellen Charakters zu sein. Welche Rolle Bakterien in diesem Krankheitsgeschehen einnehmen, ist unklar. Die dominierenden Genera in den Nasennebenhöhlen von Patienten mit CRS sind *Corynebacterium*, *Staphylococcus* und *Propionibacterium* (STEPHENSON et al., 2010; FEAZEL et al., 2012; BASSIOUNI et al., 2015). Auch *S. aureus* tritt häufig auf (FEAZEL et al., 2012; BOASE et al., 2013). In diesem Zusammenhang gibt es zwei Theorien zur Rolle der Bakterien. So gelten sie entweder als primäre Causa der Infektion und führen zu einer Dysbiose (STEPHENSON et al., 2010) oder sollen Auslöser einer Überreaktion des Immunsystems auf kommensale Mikroorganismen in der Nase sein (MATSUWAKI et al., 2011). Letztere These wurde durch eine Studie von AURORA und Mitarbeitern (2013) untermauert, in der bei Patienten mit CRS im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen erhöhte Werte der Zytokine Interleukin-(IL-) 4, IL-5, IL-8 und IL-13 sowie von eosinophilen und basophilen Granulozyten in einer Spülprobe des mittleren Nasenganges nachgewiesen wurden. Zusätzlich waren im peripheren Blut dieser Personen IL-5 produzierende Leukozyten nachweisbar. Auch die Beobachtung, dass keines der nachgewiesenen Bakterien als Pathogen identifiziert werden konnte und dass das Mikrobiom von CRS-Patienten qualitativ dem Mikrobiom gesunder Probanden sehr ähnlich war, lässt diese Schlussfolgerung plausibel erscheinen.

Zahlreiche Studien haben sich in den letzten Jahren zum Ziel gesetzt, das Mikrobiom von Nase und Nasennebenhöhlen von Patienten mit CRS zu definieren und sind zu teils widersprüchlichen Ergebnissen gekommen. Generell kann gesagt werden, dass die genaue Lokalisation der Probenentnahme in der Nase keine Rolle bei der Zusammensetzung der Bakterien spielt (BISWAS et al., 2015). Ebenso wenig ist entscheidend, ob das Probenmaterial mittels Biopsie oder Nasentupfer entnommen wird (BASSIOUNI et al., 2015; KIM et al., 2015).

Es wird angenommen, dass die bakterielle Diversität in der Nase (CHOI et al.,

2014b; BISWAS et al., 2015) und in den Nasennebenhöhlen (ABREU et al., 2012; BISWAS et al., 2015) bei an CRS erkrankten Menschen niedriger ist als bei gesunden Kontrollpatienten. FEAZEL und Mitarbeiter (2012) beschrieben, dass im Vergleich von Patienten mit CRS und gesunden Probanden die bakterielle Komposition sehr unterschiedlich war. Erstaunlicherweise stellte hierbei die Alpha-Diversität als Maß für Anzahl und Häufigkeit der Bakterientaxa keinen signifikanten Unterschied zwischen beiden Gruppen dar. Patienten mit CRS wiesen allerdings durchschnittlich weniger OTUs und auch eine weniger gleichmäßige Verteilung der Bakterien auf Genusebene auf. RAMAKRISHNAN und Mitarbeiter (2015) stellten unter dem Gesichtspunkt der Biodiversität, gemessen an Diversität, Verteilung und Anzahl der Spezies, zwischen CRS-Patienten und Kontrollpatienten keinen Unterschied fest. Kürzlich kam eine weitere Studie zu dem Schluss, dass sich die bakterielle Vielfalt und Diversität zwischen Menschen mit CRS und gesunden Kontrollpersonen nicht unterscheidet (CLELAND et al., 2016). Dennoch wiesen Menschen mit CRS weniger OTUs auf und auch hinsichtlich der Zusammensetzung der Bakterien auf Genuslevel konnten Unterschiede zwischen beiden Gruppen ausgemacht werden (FEAZEL et al., 2012; RAMAKRISHNAN et al., 2015).

AURORA und Mitarbeiter (2013) berichteten allerdings, dass bei Menschen mit CRS im Vergleich zu gesunden Kontrollpatienten eine quantitative Zunahme an Bakterienspezies zu verzeichnen war, während die qualitative Zusammensetzung ähnlich der von gesunden Personen war. Insbesondere dieses Ergebnis widerspricht dem bisherigen Forschungsstand und der Hypothese, die besagt, dass eine Dysbiose die Ursache für eine CRS darstellen könnte. Eine mögliche Erklärung ist, dass in dieser Studie nasale Lavage, also Proben mit geringer Biomasse verwendet wurden, was zu analytischen Fehlern führen könnte. Hinweisend für diese Theorie ist zudem, dass in dieser Studie eines der häufigsten Taxa *Cyanobacteria* darstellt, was jedoch in keiner vergleichbaren Studie zuvor detektiert wurde (JERVIS BARDY & PSALTIS, 2016).

Diese widersprüchlichen Ergebnisse der Studien der letzten Jahre erschweren die Definition des Mikrobioms und der Rolle, die Mikroorganismen im Krankheitsgeschehen der CRS innehaben. Allerdings nehmen BISWAS und Mitarbeiter (2015) an, dass sowohl die Variation der Zusammensetzung als auch die Quantität der Bakterien in der Nase von Menschen mit CRS vielmehr durch

individuelle Unterschiede als durch den Krankheitsstatus zu erklären sind.

Innerhalb der Gruppe der CRS-Patienten liefern Analysen der Beta-Diversität Hinweise auf einen hohen Grad an individueller Variation (RAMAKRISHNAN et al., 2015). Die hohe Variabilität der Bakterienpopulation, die vor allem innerhalb der an CRS Erkrankten zu finden ist, steht im Gegensatz zum stabileren Mikrobiom bei Gesunden und deutet abermals darauf hin, dass eine Imbalanz oder Dysbiose dieser Bakterien die treibende Kraft dieser Erkrankung sein könnte (BISWAS et al., 2015).

Nicht nur die Veränderung des Mikrobioms während der Erkrankung, sondern auch die Beeinflussung des Mikrobioms durch Therapieformen der CRS beschäftigen die aktuelle Wissenschaft und liefern widersprüchliche Ergebnisse. LIU und Mitarbeiter (2013a) stellten fest, dass eine Antibiotikagabe zur Abnahme der Alpha-Diversität führt. Eine Studie von ABREU und Mitarbeitern (2012) lieferte erste Hinweise darauf, dass eine antibiotische Therapie bei CRS-Patienten zwar ihren Beitrag zum Verlust der Diversität des Mikrobioms der Nasennebenhöhlen liefert, aber nicht die alleinige Ursache für den Diversitätsverlust und die mikrobielle Zusammensetzung bei dieser Krankheit darstellt. Die Behandlung von CRS durch endoskopische Eingriffe an den Nasennebenhöhlen mit darauf folgender systemischer Antibiose führte laut HAUSER und Mitarbeitern (2016) nicht zu einer geringeren bakteriellen Besiedlung der Nase. Vielmehr resultierte dieser Eingriff zunächst in einer Zunahme der Bakterien sowie einer strukturellen Veränderung der Zusammensetzung des Mikrobioms, wobei diese Modifikationen reversibel waren. MERKLEY und Mitarbeiter (2015) zeigten hingegen eine Zunahme der Alpha-Diversität bei Patienten, die nach Sinusoperation Antibiose erhielten.

Auch der Zusammenhang von chirurgischen Interventionen und damit einhergehenden Auswirkungen auf das nasale Mikrobiom ist bisher nicht geklärt. Patienten, die nach Sinusoperation ein besseres Outcome hatten, wiesen eine höhere mikrobielle Diversität auf. Die hohe Abundanz von *Corynebacterium* war mit einem guten, die von *Staphylococcus* spezie (*Staphylococcus* spp.) hingegen mit einem schlechten postoperativen Outcome assoziiert (RAMAKRISHNAN et al., 2015). Eine andere Studie kam zu dem Schluss, dass die Diversität des Nasenmikrobioms nach chirurgischer Versorgung abnahm. *Acinetobacter johnsonii* war in der Kontrollgruppe präsenter und wurde bezeichnenderweise in der postoperativen Gruppe häufiger bei den Personen nachgewiesen, die eine

verbesserte Lebensqualität aufwiesen. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Bakterien nicht nur in Krankheitsprozessen, sondern auch bei der Aufrechterhaltung der Gesundheit eine Rolle spielen (CLELAND et al., 2016).

### 2.2.3. Allergische Rhinitis

Bereits 1989 vermutete STRACHAN, dass die steigende Anzahl an atopischen Erkrankungen wie Heuschnupfen ein Resultat der verringerten Möglichkeiten des Körpers ist, sich mit Infektionen auseinanderzusetzen. Später wurde diese Theorie als Hygienehypothese bekannt und dient seither als ein Erklärungsmodell für die Entstehung dieser Krankheiten (BACH, 2002). Betrachtet man das nasale Mikrobiom betroffener Personen, können Veränderungen festgestellt werden: Menschen mit Heuschnupfen haben während der Pollensaison eine größere Vielfalt von Bakterien im mittleren Nasengang als nicht allergische Probanden (CHOI et al., 2014a). Einen Erklärungsversuch hierfür liefert eine ältere Studie. Hier wurden mittels Computertomographie (CT) die Nasennebenhöhlen von Patienten mit akuter viraler Rhinitis und Menschen, die zusätzlich an einer allergischen Immunglobulin-E- (IgE-) medierten Rhinitis litten, verglichen. Die Allergiepatienten wiesen stärkere Veränderungen der Nebenhöhlen auf. Diese führen zu einer veränderten Sinusfunktion und können das Risiko einer bakteriellen Rhinitis erhöhen (ALHO et al., 2003).

### 2.2.4. Otitis media

Auch das Mikrobiom im Nasopharynx von Kleinkindern zeigt während einer akuten Mittelohrentzündung Veränderungen. Obwohl *S. pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* (*H. influenzae*) und *Moraxella catarrhalis* (*M. catarrhalis*) zu den physiologischen nasalen Mikroben während der Kindheit gezählt wurden (FADEN et al., 1991; ANIANSSON et al., 1992), wiesen FADEN und Mitarbeiter (1997) sie auch als die dominierenden Bakterien im Zusammenhang mit akuter *Otitis media* nach. HILTY und Mitarbeiter (2012) konnten ebenfalls zeigen, dass im Nasopharynx betroffener Kinder Bakterien dominieren, die auch für eine akute Mittelohrentzündung verantwortlich gemacht werden können, wie Moraxellaceae, Streptococcaceae und Pasteurellaceae.

Die mikrobielle Besiedelung stellt sich bei akuter Otitis zwar als weniger reich und stabil dar, weist allerdings eine höhere Kolonisationsdichte als bei gesunden Probanden auf (HILTY et al., 2012). Entsprechend ist eine nasale Besiedlung mit

*S. pneumoniae*, *H. influenzae* und *M. catarrhalis* mit einem niedrigen Grad an Diversität des Mikrobioms im oberen Respirationstrakt verbunden (PETTIGREW et al., 2012). Zudem ist die nasale mikrobielle Zusammensetzung sowohl bei gesunden als auch bei Kindern mit Otitis weniger divers und ausgeglichen, wenn *S. pneumoniae* in der Nase nachgewiesen wird (LAUFER et al., 2011). Eine frühe Kolonisation der Nase von Kleinkindern mit *M. catarrhalis* bedingt für diese ein erhöhtes Risiko, an akuter *Otitis media* zu erkranken (FADEN et al., 1997). Kinder mit Infektionen der oberen Atemwege, bei denen im Nasopharynx Bakterien wie *S. pneumoniae*, *H. influenzae* oder *M. catarrhalis* kulturell nachgewiesen wurden, erkrankten mit einer höheren Wahrscheinlichkeit innerhalb der folgenden drei Wochen zusätzlich an einer akuten Mittelohrentzündung als Kinder, bei denen diese Bakterien nicht nachgewiesen wurden. Folglich wird diesen Bakterien eine kausative Pathogenität hinsichtlich einer *Otitis media* zugeschrieben (REVAI et al., 2008). Auch *Haemophilus*, *Actinomyces*, *Rothia*, *Neisseria* und *Veillonella* erhöhen die Wahrscheinlichkeit einer Otitis. Letztere Taxa wurden bisher nicht zu den pathogenen Erregern einer Mittelohrentzündung gezählt, allerdings scheinen sie trotzdem eine wichtige wegbereitende Rolle zu spielen (LAUFER et al., 2011).

Gleichzeitig herrscht bei einer akuten Mittelohrentzündung ein Rückgang der zu den Kommensalen zählenden Taxa wie etwa Staphylococcaceae vor (HILTY et al., 2012). Es wurden auch Taxa identifiziert, die negativ mit einer Besiedlung mit Pathogenen und dem Auftreten einer akuten *Otitis media* korrelierten. Ein verringertes Risiko für die Ausbildung einer Otitis stellte beispielsweise die Besiedlung mit potentiell protektiven Bakterien wie *Corynebacterium* und *Dolosigranulum* oder *Propionibacterium*, *Lactococcus* und *Staphylococcus* dar (LAUFER et al., 2011). Kinder, die innerhalb der letzten sechs Monate Antibiose erhielten und eine höhere Fülle an Taxa inklusive *Lactococcus* und *Propionibacterium* aufwiesen, hatten überraschenderweise sogar eine geringere Wahrscheinlichkeit, akute *Otitis media* zu entwickeln als gesunde Kinder. Auch Kinder, die in den letzten sechs Monaten keine antibiotische Vorbehandlung erhielten, ein geringes Vorkommen an *Streptococcus* und *Haemophilus* aufwiesen, jedoch ein hohes Maß an *Corynebacterium* und *Dolosigranulum* beherbergten, hatten ein geringeres Risiko, eine akute *Otitis media* zu entwickeln (PETTIGREW et al., 2012).



### **2.2.5. Pneumonie**

Im Vergleich zum nasopharyngealen Mikrobiom von Kindern mit Pneumonien zeigt das Mikrobiom von gesunden Kindern eine größere Diversität und ein breiteres Spektrum an weniger häufigen Taxa (SAKWINSKA et al., 2014). *S. pneumoniae* hat das Potential, invasive Pneumokokkeninfektionen, die zu Sepsis, Meningitis oder Pneumonie führen können, zu verursachen (BOGAERT et al., 2004). Das Bakterium kommt bei gesunden Menschen vermehrt im Nasopharynx von Personen mit einem diversen nasalen Mikrobiom vor und unterstützt bei Neuinfektion die mikrobielle Heterogenität (CREMERS et al., 2014).

### **2.3. Einfluss von prophylaktischen und therapeutischen Maßnahmen**

Das Mikrobiom ist nicht statisch und kann durch prophylaktische und therapeutische Maßnahmen beeinflusst werden, die im Folgenden dargestellt werden.

#### **2.3.1. Einfluss von Impfungen**

Die Impfung von Kleinkindern mit einem multivalenten, konjugierten Pneumokokkenimpfstoff (Pneumococcal conjugate vaccine 7, PCV7) ruft eine Veränderung des nasalen Mikrobioms hervor. So wiesen Kleinkinder, die nach der erfolgten Impfung an einer akuten *Otitis media* erkrankten, eine geringere Anzahl von kommensalen Mikroorganismen wie beispielsweise Streptococcaceae und Corynebacteriaceae auf (HILTY et al., 2012; BIESBROEK et al., 2014c). Zudem stellten sich nach der Vakzination eine temporär veränderte Zusammensetzung und eine größere Diversität der mikrobiellen Besiedlung des Nasopharynx ein. Die Immunisierung bewirkte auch einen Rückgang der im Impfstoff verwendeten Pneumokokkenserotypen und eine zeitgleich stattfindende Zunahme anderer Pneumokokkenserovare und Anaerobier (BIESBROEK et al., 2014c). Auch die Verabreichung einer Lebendvakzine gegen das Grippevirus H1N1 (Hämagglutinin 1, Neuraminidase 1) ruft eine Änderung des nasalen Mikrobioms bei gesunden, jungen Erwachsenen hervor. Nach der Impfung können Bakterientaxa, die vor der Impfung selten waren, häufiger nachgewiesen werden. Es besteht zudem ein Zusammenhang zwischen der körpereigenen Produktion an influenzaspezifischen Antikörpern und dem vermehrten Auftreten verschiedener Bakterienstämme (SALK et al., 2016). Folglich gehen SALK und Mitarbeiter (2016) davon aus, dass

Mikrobiom und respiratorisches Immunsystem eng miteinander zusammenhängen und dass es bestimmte Bakterienstämme gibt, die für eine physiologische Immunantwort und Gesundheit des Respirationstrakts verantwortlich sind. Auch die Forschungsgruppe um TARABICHI kam im Jahr 2015 zu dem Ergebnis, dass sich das nasale Mikrobiom nach erfolgter intranasaler Lebendimpfung mit Influenzaviren ändert. Sie schlussfolgerten, dass mit der Stimulierung der Immunantwort in Form von erhöhter Interferonproduktion durch den viralen Erreger ein Überhandnehmen von potentiell pathogenen Bakterien begünstigt wird. Die virale Infektion des oberen Respirationstrakts stellt demnach die Weichen für eine sekundäre Besiedlung mit pathogenen Bakterien und kann somit im Hinblick auf eine mögliche bakterielle Infektion schädlich sein (TARABICHI et al., 2015). Bei Individuen fortgeschrittenen Alters scheint die Impfung hingegen keinen Einfluss auf das Nasenmikrobiom zu haben. So konnte eine Studie von WHELAN und Mitarbeitern (2014) bei Bewohnern eines Altenheimes feststellen, dass eine vorausgegangene Impfung keine Veränderung in der Komposition des nasalen Mikrobioms nach sich zog.

### **2.3.2. Einfluss von Antibiotika**

Es ist bekannt, dass Antibiotika einen negativen Einfluss auf das Mikrobiom haben (LEMON et al., 2012). Insbesondere die Verabreichung von antibakteriell wirksamen Medikamenten bei Kindern wird zunehmend zum Gegenstand der Forschung (BLASER, 2011). Beispielsweise wies das nasale Mikrobiom von Kindern mit akuter Mittelohrentzündung, die kürzlich mit Antibiose vorbehandelt worden waren, Veränderungen auf: Es wurden seltener kommensale Bakterien wie Streptococcaceae (ausschließlich *Streptococcus pneumoniae*) und Corynebacteriaceae, jedoch häufiger potentielle Pathogene wie Enterobacteriaceae und Pasteurellaceae nachgewiesen (HILTY et al., 2012). Auch die Langzeitfolgen des Einsatzes von Antibiose im Kindesalter werfen Fragen auf. HIRSCH und Mitarbeiter untersuchten im Jahr 2016 in einer Längsschnittstudie, inwiefern die Verabreichung von Antibiotika im Kleinkindalter das Risiko, später an einer Allergie zu erkranken, begünstigt. Im Vergleich litten Kinder mit einer antibiotischen Vorbehandlung später häufiger an Allergien wie allergischer Rhinitis (HIRSCH et al., 2016). Darüber hinaus scheinen manche Krankheiten des Respirationstrakts durch die Einnahme von antibiotisch wirksamen Medikamenten begünstigt zu werden. Demnach erhöht eine Antibiose beim Menschen unabhängig

von Art und Verschreibungsgrund signifikant das Risiko, innerhalb der darauffolgenden zwei Jahre an einer CRS zu erkranken (MAXFIELD et al., 2016). Auch bezüglich der Lebensqualität von Patienten mit CRS konnte gezeigt werden, dass diejenigen, die in den letzten zwei Jahren Antibiose erhalten hatten, eine gemessen an Krankheitsparametern schlechtere Lebensqualität aufwiesen (MAXFIELD et al., 2016). Bei der Therapie von Krankheiten des oberen Respirationstrakts läuten neue Forschungsergebnisse ein Umdenken im täglichen Antibiotikagebrauch ein: Bei Patienten mit CRS wurde festgestellt, dass sich das Mikrobiom in den maxillaren Nebenhöhlen nach der Therapie mit Antibiose und Kortikosteroiden verändert, hierbei jedoch große individuelle Unterschiede aufweist. Bei allen Beteiligten wurde ein signifikanter Rückgang der Diversität und Gleichmäßigkeit des Mikrobioms nachgewiesen. Nicht überraschend war außerdem die Tatsache, dass die Nebenhöhlen der Patienten nach antibiotischer Therapie vornehmlich von Bakterientaxa besiedelt wurden, die nicht mehr auf den verwendeten antibakteriellen Wirkstoff ansprachen (LIU et al., 2013a). Der Einsatz von Antibiotika ist folglich nicht nur aufgrund der herbeigeführten Veränderung des Mikrobioms kritisch zu sehen, sondern auch aufgrund ihres Einflusses auf die Resistenzlage von Bakterien. Beispielsweise wurde in einer randomisierten Studie gesunden Erwachsenen über zehn Tage systemisch Antibiose in Form von Ciprofloxacin oder Clindamycin verabreicht. Der Einsatz von Ciprofloxacin führte dazu, dass unmittelbar nach Beendigung der Antibiotikagabe bei den Testpersonen *Propionibacterium acnes* (*P. acnes*) in der Nase im Vergleich zur placebokontrollierten Gruppe kulturell weniger nachgewiesen wurde, nach einem Monat jedoch *P. acnes* wieder Werte ähnlich der Placebogruppe annahm. Erstaunlicherweise nahm die Anzahl der gegenüber Ciprofloxacin resistenten *P. acnes* zwei Monate und ein Jahr nach Beendigung der Antibiotikatherapie in der Verumgruppe immer noch zu. In dieser Studie hatte die systemische Verabreichung von Clindamycin jedoch keinen Einfluss auf die kulturell nachweisbaren anaeroben Mikrobiota der Nase und deren Resistenzlage (RASHID et al., 2015). Eine weitere Studie untersuchte das Vorkommen Flouroquinolon-resistenter Staphylokokken nach der systemischen Gabe von Flouroquinolon. Bei aus der Nase isolierten Staphylokokken wurde eine Zunahme von pathogenen und multiresistenten Stämmen nachgewiesen (MUNIER et al., 2015).

### 2.3.3. Einfluss von Kortikosteroiden

Topisch intranasal angewendete Kortikosteroide beeinflussen das nasale Mikrobiom beim gesunden Menschen. So wurde nach Kortisontherapie ein häufigeres Vorkommen von *Dolosigranulum* und *Simonsiella* bei einem geringeren Vorkommen von *Campylobacter* beobachtet (LIU et al., 2015).

### 2.3.4. Einfluss von Probiotika

Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) definiert Probiotika als lebende mikrobielle Bestandteile, die, wenn sie in entsprechenden Mengen mit der Nahrung aufgenommen werden, gesundheitliche Vorteile versprechen und in der Anwendung beim Menschen als sicher gelten (WHO/FAO, 2002). Besondere Vorsicht gilt es allerdings beim Einsatz von Probiotika bei immunsupprimierten Personen und Neugeborenen walten zu lassen, da hier in manchen Fällen eine Bakteriämie und Sepsis entstehen kann (WAGNER et al., 1997; DE GROOTE et al., 2005; LAND et al., 2005; BOYLE et al., 2006; MANZONI et al., 2011).

Obwohl große Unterschiede zwischen den einzelnen Mikroorganismen bestehen, ist mittlerweile bekannt, dass Probiotika antimikrobielle Produkte produzieren können, die in der Lage sind, pathogene Bakterien zu eliminieren (NAIDU et al., 1999) und toxininduzierte Prozesse zu unterbinden (POTHOULAKIS et al., 1993). Darüber hinaus konkurrieren sie mit pathogenen Bakterien um Nährstoffe und Bindungsplätze, vermindern so deren Präsenz und schwächen die Virulenz der Pathogene ab (BROOK, 2005). Mittlerweile geht man davon aus, dass Probiotika sowohl auf humoraler als auch zellulärer Ebene immunstimulierende Eigenschaften haben, die abhängig vom jeweiligen Bakterienstamm sind (LENOIR-WIJKOOP et al., 2007). SHIDA und Mitarbeiter (2011) postulierten, dass Probiotika in zwei Kategorien einzuteilen sind: Zum einen die immunstimulierenden, die die Eigenschaft haben, Interleukin 12 (IL-12) zu induzieren. Auf diese Weise unterstützen sie die Wirtsabwehr durch Aktivitätssteigerung der natürlichen Killerzellen und der T-Helferzellen vom Typ 1 (Th-1). Zum anderen gibt es die immunregulierenden Probiotika, welche Interleukin 10 (IL-10) induzieren und die regulatorischen T-Zellen aktivieren. Eine Immunantwort wird somit unterdrückt.

Auch zahlreiche klinische Studien erforschten die Wirkung von Probiotika auf Erkrankungen des oberen Respirationstrakt des Menschen: OUWEHAND und Mitarbeiter gingen im Jahr 2009 der Frage nach, ob die Gabe von Probiotika einen

Einfluss auf das Krankheitsbild der allergischen Rhinitis hat. Kindern mit Birkenpollenallergie wurde in einer Doppelblindstudie ein Probiotikum, welches *Lactobacillus acidophilus* und *Bifidobacterium lactis* enthielt, über vier Monate oral verabreicht. Die Pollenallergie war assoziiert mit einer Veränderung der Zusammensetzung der fäkalen Mikrobiota. In der Probiotikagruppe wurden die eingenommenen Bakterien vermehrt in Stuhlproben nachgewiesen, während die Bakterienstämme, die im Zuge der Allergie verringert waren, trotz Probiotikagabe weiterhin unterrepräsentiert waren. Allerdings konnte gezeigt werden, dass die Kombination verschiedener Probiotika eine polleninduzierte Infiltration von eosinophilen Granulozyten in die nasale Mukosa verhindern und auch klinische nasale Symptome verringern konnte (OUWEHAND et al., 2009).

Bezüglich des Krankheitsgeschehens der CRS wird angenommen, dass das Bakterium *S. aureus* hier ätiologisch eine entscheidende Rolle spielt, indem es mitverantwortlich für die Schwere der Erkrankung ist und einen Einfluss auf das Outcome nach operativer Versorgung bei CRS hat. Erfolgversprechend sind Untersuchungen am Mausmodell. Diesbezüglich konnte gezeigt werden, dass eine intranasale Inokulation mit *Staphylococcus epidermidis* (*S. epidermidis*) bei Mäusen mit Sinusitis das Potential hat, gegen das potentiell pathogene Bakterium *S. aureus* probiotisch wirksam zu sein, indem es zu einer nachweislichen Verringerung von *S. aureus* führte (CLELAND et al., 2014). Im Rahmen zahlreicher Studien wurde mittlerweile nachgewiesen, dass verschiedene oral eingenommene Probiotika im Vergleich zu Placebo erfolgreicher darin waren, Infektionen des Respirationstraktes zu verhindern und somit für eine niedrigere Rate an akuten Erkrankungen der oberen Atemwege und einem geringeren Einsatz von Antibiotika verantwortlich waren. Trat allerdings eine Krankheit auf, hatte eine Vorbehandlung mit Probiotikum keinen Einfluss auf die Dauer dieser Episode (RIO et al., 2002; HATAKKA et al., 2007; RAUTAVA et al., 2009; HOJSAK et al., 2010b; HOJSAK et al., 2010a; HAO et al., 2011). In einer randomisierten, doppelgeblindeten Multicenterstudie wurde hingegen nachgewiesen, dass über Siebzigjährige, die täglich Probiotika in Form von Joghurtgetränken zu sich nahmen, eine deutlich kürzere Krankheitsdauer bei Infektionen des oberen Respirationstrakts aufwiesen (GUILLEMARD et al., 2010). Allerdings sollte bei der Interpretation des Studienergebnisses beachtet werden, dass dieses Forschungsprojekt finanziell von namhaften Lebensmittelkonzernen unterstützt

wurde. Bereits 2003 berichteten auch GLUCK und GEBBERS dass der regelmäßige Konsum eines probiotischen Getränks, im Gegensatz zum täglichen Verzehr von gewöhnlichem Joghurt, das Vorkommen potentiell pathogener Bakterien in der Nasenhöhle signifikant reduzierte. Auch der lokale Einsatz von Probiotika in der Nase wurde kürzlich zum Gegenstand der Forschung: Gesunden Probanden wurden hierbei Milchsäurebakterien der Honigbiene *Apis mellifera* einmalig lokal in die Nase eingebracht. Hintergrund der Studie war die Annahme, dass Milchsäurebakterien die kommensale Flora aufbauen, entzündlichen Prozessen vorbeugen und somit bei der Therapie von Erkrankungen der Nase von Vorteil sind. Dieser Eingriff veränderte jedoch das nasale Mikrobiom nicht, rief keine Immunreaktion hervor und führte zu keiner klinisch feststellbaren Veränderung (MARTENSSON et al., 2016). YAQOOB (2014) nahm an, dass vor allem ältere Individuen von einer probiotischen Behandlung profitieren könnten, da im Alter die Biodiversität der Darmbakterien abnimmt.

Kürzlich wurde der Einfluss oraler Probiotika auf die Zusammensetzung des respiratorischen Mikrobioms von gesunden, jungen Versuchskatzen untersucht. Hierzu wurde das Bakterienvorkommen von Oropharynx und Bronchoalveolarlavage mit dem Mikrobiom selbiger Katzen vier Wochen nach Verabreichung eines Probiotikums verglichen. Die mikrobielle Vielfalt nahm zu und probiotische Spezies konnten signifikant häufiger nachgewiesen werden. Allerdings änderte sich die Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaft nur bei der Lungenspülprobe, wohingegen der Oropharynx diesbezüglich keine signifikante Veränderung aufzeigte. Eine orale Einnahme von Probiotika scheint somit das respiratorische Mikrobiom von Katzen zu beeinflussen. In wie fern diese Modifikation für therapeutische Zwecke bei Atemwegeerkrankungen der Katze genutzt werden kann, muss in zukünftigen Studien evaluiert werden, stellt aber laut diesen Ergebnissen eine zukünftige Möglichkeit der Therapieform bei Atemwegserkrankungen dar (VIENTOS-PLOTTS et al., 2017b).

### **2.3.5. Einfluss von Präbiotika**

Auch Präbiotika sind vornehmlich aus dem Bereich der Gastroenterologie bekannt und definiert als ausgewählte, fermentierte Inhaltsstoffe, die spezifische Veränderungen sowohl in der Zusammensetzung als auch in der Aktivität der Mikroflora des Gastrointestinaltrakts hervorrufen. Diese Beeinflussung des Mikrobioms soll zu einer Verbesserung von Wohlbefinden und Gesundheit führen

(ROBERFROID, 2007). In einer randomisierten, placebokontrollierten Doppelblindstudie konnte gezeigt werden, dass die orale Verabreichung von sowohl Prä- als auch Probiotika das Risiko bei Kleinkindern, an einer viralen Erkrankung des Respirationstrakts zu erkranken, signifikant reduzierte (LUOTO et al., 2014). LUOTO und Mitarbeiter (2014) schlussfolgern deshalb, dass die Modifikation der Mikrobiota im Darm durch spezifische Prä- und Probiotika eine neuartige und kostengünstige Methode darstellt, um Rhinovirusinfektionen zu verhindern.

### **3. Felines Mikrobiom des oberen Respirationstrakts**

Bisher gibt es keine Studie, die sich mit dem nasalen Mikrobiom von Katzen beschäftigt. Das Vorkommen einzelner Bakterien im oberen Atmungstrakt wurde hingegen bereits in unterschiedlichen Forschungsprojekten thematisiert.

#### **3.1. Physiologisches Bakterienvorkommen**

Die Untersuchung der physiologischen bakteriellen Besiedlung der Nase von Katzen spielte bisher kaum eine Rolle. Vereinzelt beschäftigten sich Studien mit dem Nachweis von potentiellen Pathogenen in der feline Nase: Demnach konnten JOHNSON und Mitarbeiter (2004) Mykoplasmen sowohl in Nasenspülproben als auch in Nasenbiopsien von unselektierten Katzen nachweisen. Allerdings lag keine Vorgeschichte der Patienten vor, weshalb eine respiratorische Erkrankung dieser Katzen nicht eindeutig auszuschließen ist. Hingegen wurde im Rahmen einer anderen Studie *Mycoplasma* spp. sowohl in Nasenspülproben als auch in Nasentupfern von respiratorisch gesunden Katzen nachgewiesen (SCHULZ et al., 2014). Weiterhin konnten bei klinisch gesunden Katzen, die in einem Langzeitpflegeheim lebten, in der kulturellen Anzüchtung von Nasentupferproben Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA) festgestellt werden (COUGHLAN et al., 2010). Darüber hinaus wurden bei klinisch gesunden Katzen, die in menschlicher Obhut lebten, antibiotikaresistente *Escherichia coli* (*E. coli*) aus Nasentupfern kultiviert (DAVIS et al., 2011).

#### **3.2. Pathologische Veränderungen**

Im Vergleich zur physiologischen bakteriellen Besiedlung erfuhr die Untersuchung des oberen Respirationstrakts von erkrankten Katzen im Hinblick auf das Bakterienvorkommen mehr Beachtung.

##### **3.2.1. Nasale Neoplasien**

In einer Studie wurde das Vorkommen unterschiedlicher Pathogene in Nasenspülproben von Katzen mit Nasentumoren mithilfe bakteriologischer Kulturen retrospektiv untersucht. Hierbei konnten sowohl Pseudomonaden als auch Chlamydien festgestellt werden (GALLER et al., 2012).

##### **3.2.2. Rhinitis**

In einer Fallstudie mit zwei Tierheimkatzen, die nach perakuter Erkrankung mit Symptomen einer Rhinitis und Meningitis verstarben, wurde in Nasentupfern



*Streptococcus equi* subspezies *zooepidemicus*, nachgewiesen., kulturell detektiert und für die Erkrankungen verantwortlich gemacht (BRITTON & DAVIES, 2010). Dabei handelt es sich um einen Erreger, der vormals nur bei Pferden und Hunden mit respiratorischen Infektionen nachgewiesen werden konnte.

Die Ätiologie der CRS bei Katzen ist noch nicht vollständig geklärt. Von verschiedenen Autoren wurden Schädigungen der Conchen durch virale Infektionen (CAPE, 1992), durch unterschiedliche Mikroorganismen ausgelöste lokale Entzündungen (CAPE, 1992) sowie eine Dysregulation der Mukusproduktion ätiologisch für das Entstehen der CRS verantwortlich gemacht (JOHNSON & KASS, 2009). Oftmals scheint die CRS durch bakterielle Sekundärinfektionen verkompliziert zu werden. Aus Nasenhöhlen von Katzen mit CRS konnte beispielsweise eine größere Anzahl an potentiell pathogenen Keimen isoliert werden als bei Kontrolltieren, die keine respiratorischen Auffälligkeiten zeigten (JOHNSON et al., 2005).

### **3.2.3. Katzenschnupfen**

Obwohl mittlerweile seit mehr als 40 Jahren Impfstoffe auf dem Markt sind, stellt Katzenschnupfen (feline upper respiratory tract disease = FURTD) immer noch ein signifikantes klinisches Problem dar (GASKELL, 2004). Dies scheint der Grund dafür zu sein, dass diese Infektionskrankheit in der Forschung große Beachtung gefunden hat.

Vor allem Katzen, die jünger als ein Jahr sind, erkranken an FURTD (BINNS et al., 2000; BANNASCH & FOLEY, 2005; DI MARTINO et al., 2007). Daneben spielen aber auch Faktoren wie der Ernährungszustand (AUGUST, 1990), Hygiene (HELPS et al., 2005) und in Tierheimen sozialer, menschlicher Kontakt zu den Tieren (GOURKOW & PHILLIPS, 2015) eine Rolle. Insbesondere Umgebungsfaktoren haben einen hohen Einfluss auf die Wahrscheinlichkeit einer Infektion mit einem entsprechenden Erreger und den Ausbruch der Krankheit (PEDERSEN et al., 2004). Leben Katzen auf engstem Raum in Mehrkatzenhaushalten, bei Züchtern oder in Tierheimen zusammen oder sind sie einem hohen Stresslevel ausgesetzt - was oftmals Hand in Hand geht - haben sie ein höheres Risiko, an FURTD zu erkranken (AUGUST, 1990; BINNS et al., 1999; BINNS et al., 2000). Allerdings wurde auch bei Freigängern beschrieben, dass sie im Vergleich zu Hauskatzen einem höheren Infektionsrisiko hinsichtlich für

FURTD ausgesetzt sind (DI MARTINO et al., 2007). Streuner haben diesbezüglich ebenfalls ein höheres Risiko als Katzen, die in menschlicher Obhut leben (GOURKOW et al., 2013).

Erreger, denen in Bezug auf FURTD eine primäre Pathogenität zugeschrieben wird, sind die Viren felines Herpesvirus 1 (FHV-1) und felines Calicivirus (FCV) (HARBOUR et al., 1991; SYKES et al., 2001; PEDERSEN et al., 2004), außerdem die Bakterien *Chlamydia felis* (*C. felis*) (WILLS et al., 1984; MCDONALD et al., 1998; SYKES et al., 1999) und *Bordetella bronchiseptica* (*B. bronchiseptica*) (MCARDLE et al., 1994; BINNS et al., 1999). Die Rolle von *Mycoplasma* spp. wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Von einigen Autoren werden sie als Primärerreger eingestuft (BANNASCH & FOLEY, 2005; LITSTER et al., 2015), wohingegen andere diese Einordnung in Frage stellen, da *Mycoplasma* spp. auch bei klinisch gesunden Katzen isoliert wurde (FERNANDEZ et al., 2017). Katzen können jedoch auch eine Coinfektion (SYKES et al., 2001; HELPS et al., 2003; DI MARTINO et al., 2007) oder eine subklinische Infektion (VEIR & LAPPIN, 2010; LITSTER et al., 2015; FERNANDEZ et al., 2017) mit diesen fünf Haupterregern aufweisen.

Es wird davon ausgegangen, dass Infektionen mit primär pathogenen Viren wie FHV-1 oder FCV zudem Sekundärinfektionen mit weiteren Bakterien begünstigen (SPINDEL et al., 2008). Andere Bakterien, die aus der Nase von Katzen mit FURTD häufig kulturell angezüchtet wurden, sind *Pasteurella* spp., *Pseudomonas* spp. (SCHULZ et al., 2006; VEIR et al., 2008), *Staphylococcus* spp. und *Streptococcus* spp. (SCHULZ et al., 2006; SPINDEL et al., 2008; VEIR et al., 2008). Vereinzelt wurde auch der kulturelle Nachweis von Bakterien wie *Moraxella* spp. (VEIR et al., 2008), *Cornebacterium* spp. (SCHULZ et al., 2006; VEIR et al., 2008), *Actinomyces* spp. (VEIR et al., 2008) und *Micrococcus* spp. (SCHULZ et al., 2006; VEIR et al., 2008) beschrieben. Bei Katzen mit respiratorischen Symptomen konnten außerdem *E. coli*, *Enterobacter* spp., *Proteus* spp., *Klebsiella* spp., *Acinetobacter* spp., *Serratia* spp., *Bacillus cereus*, *Flavobacter* spp., *Citrobacter* spp., *Achromobacter* spp. und *Diplococcus* spp. kulturell aus Nasenproben angezüchtet werden (SCHULZ et al., 2006).

#### **4. Nachweisverfahren zur Detektion von Bakterien im oberen Respirationstrakt**

Im Folgenden werden die unterschiedlichen Nachweisverfahren für Bakterien im oberen Atmungstrakt dargestellt. Dabei bleibt zu bedenken, dass jeder physikalische, chemische und biologische Schritt, der an einer molekularen Analyse beteiligt ist, das Ergebnis verzerren kann (VON WINTZINGERODE et al., 1997).

##### **4.1. Kulturelle Methoden**

Bereits seit Jahrzehnten ist bekannt, dass nicht alle Mikroorganismen kultivierbar sind (STALEY & KONOPKA, 1985). Tatsächlich kann sogar die überwältigende Mehrheit (>99 %) (AMANN et al., 1995) mit Standardmethoden *in vitro* nicht angezüchtet werden (HEAD et al., 1998). So wurde lange Zeit nur ein Bruchteil aller vorhandenen Bakterien nachgewiesen, während über den Rest der Mikroorganismen, die nicht kultiviert werden konnten, wenig Wissen bestand. Der erste Beweis für die Existenz nicht-kultivierbarer Mikroorganismen konnte aber erst Mitte der 80er Jahre erbracht werden, als mit Hilfe der Analyse der 16S-ribosomalen Ribonukleinsäure (16S-rRNA) dargelegt wurde, dass durch bakterielle Kultivierung nur 1 % der in der Tiefsee vorkommenden Bakterien nachgewiesen werden können (ACHENBACH-RICHTER et al., 1987; VOSSBRINCK et al., 1987; WOESE, 1987). Lange Zeit war die einzige Möglichkeit, Bakterien zu identifizieren, einzelne Kulturen zu isolieren und sie danach aufgrund ihrer verschiedenen physiologischen und biochemischen Eigenschaften weiter zu bestimmen (AMANN et al., 1995). Viele Bakterien können nicht kultiviert werden, weil sie nur in einem sehr spezifischen Milieu wachsen (VON WINTZINGERODE et al., 1997). Darüber hinaus entwickelt sich auf einem künstlichen, homogenen Medium typischerweise nur ein kleiner Teil der Organismen, während das Wachstum anderer unterdrückt wird oder erst gar nicht möglich ist. Einem Großteil der Ansprüche von Mikroorganismen kann man unter Laborbedingungen *in vitro* nicht nachkommen. Die unterschiedlichen Replikationsraten der Mikroorganismen stellen einen weiteren einschränkenden Faktor dar. Schnellwachsende Bakterien haben demnach einen Selektionsvorteil (TAN et al., 1996). Zudem sind kulturelle Methoden sehr zeitintensiv (VON WINTZINGERODE et al., 1997). Somit scheitert die Kultur in vielen Fällen daran, den unter natürlichen Umständen

vorherrschenden ökologischen Nischen und symbiotischen Beziehungen gerecht zu werden (TAN et al., 1996). Der kulturelle Nachweis gilt besonders unter dem Gesichtspunkt der Evaluierung der mikrobiellen Vielfalt als sehr limitiert (WARD et al., 1990; WAGNER et al., 1993; AMANN et al., 1995; TAN et al., 1996).

Im Rahmen einer Studie an humanen Patienten mit zystischer Fibrose wurde die Ausbeute an nachweisbaren Bakterien bei einer herkömmlichen Kultur und einer neuartigen, speziellen Feuchtigkeitskammer verglichen. Bei der Standardmethode wurden die Bakterien, wie empfohlen, zwei bis drei Tage angezüchtet, in der Feuchtigkeitskammer hingegen für zehn Tage. Interessanterweise konnten trotz dieser längeren Zeitspanne zwar mehr Bakterien aus Tupfern des Pharynx und aus Speichelproben nachgewiesen werden, bei Nasentupfern schien dies jedoch kaum eine Rolle zu spielen (RACLAVSKY et al., 2016).

Humanmedizinische Studien an Patienten mit CRS verglichen die 16S-Sequenzierung mit dem kulturellen Nachweis und kamen zu dem Ergebnis, dass die Sequenzierung eine deutlich höhere Biodiversität nachweist und somit umfassendere, prägnantere und sensitivere Ergebnisse liefert (STEPHENSON et al., 2010; FEAZEL et al., 2012; MERKLEY et al., 2015). Erstaunlicherweise wurden in der Studie von FEAZEL und Mitarbeitern (2012) in der Kultur auch Mikroorganismen nachgewiesen, die mithilfe der Sequenzierungsmethode nicht detektiert werden konnten. Denkbar ist laut den Autoren eine fehlerhafte Identifikation dieser Isolate aufgrund gleicher morphologischer und physiologischer Charakteristika ähnlicher Spezies oder das Fehlen des detektierten Bakteriums in der Datenbank.

#### **4.2. Molekularbiologische Methoden**

Die Diskrepanz zwischen kultivierbaren und tatsächlich vorhandenen Mikroorganismen hebt heutzutage die Bedeutung von kulturunabhängigen Methoden in den Vordergrund (AMANN et al., 1995; HEAD et al., 1998; HUGENHOLTZ et al., 1998).

##### **4.2.1. Polymerasekettenreaktion (PCR)**

Bereits vor 20 Jahren war bekannt, dass kulturunabhängige Methoden es ermöglichen, Informationen hinsichtlich der genetischen Diversität, der Anzahl an Bakterienspezies und der mikrobiellen Zusammensetzung zu liefern (AMANN et al., 1995; HUGENHOLTZ et al., 1998). Obwohl bekannt ist, dass auch molekulare

Techniken, die auf der Polymerasekettenreaktion (PCR) basieren, ein verzerrtes Bild der vorhandenen Mikroorganismen liefern (FARRELLY et al., 1995; SUZUKI & GIOVANNONI, 1996; VON WINTZINGERODE et al., 1997), gehören sie zu den wichtigsten Methoden, um die phylogenetische Vielfalt der Bakterien, die Tiere (WEISBURG et al., 1991; WHITEHOUSE et al., 2015) und Menschen (GIANCOLA et al., 2016) besiedeln, zu untersuchen.

Methoden, die auf der Analyse von DNA basieren, bedienen sich oftmals der PCR. Diese beruht auf dem Prinzip, unter Zuhilfenahme genetischer Marker einen definierten Teil der DNA zu amplifizieren. Die ersten kulturunabhängigen Untersuchungsmethoden basierten auf einer niedrigen Durchsatzrate der Sequenzierung des Gens der bakteriellen 16S-ribosomalen Ribonukleinsäure (16S-rRNA) (SCHMIDT et al., 1991; TRINGE & HUGENHOLTZ, 2008). Universelle Primer können die Zielgene auch innerhalb einer großen Vielfalt an verschiedenen Organismen ausmachen. Das bedeutendste Zielgen ist das 16S-rRNA-Gen (HUGENHOLTZ et al., 1998). Die 16S-rRNA kodiert für einen Bestandteil des prokaryotischen Ribosoms (LANE, 1991) und ist der häufigste verwendete genetische Marker bei Untersuchungen der bakteriellen Phylogenie und Taxonomie. Gründe hierfür sind, dass das entsprechende Gen bei nahezu allen Bakterien vorzufinden ist. Darüber hinaus bietet das 16S-rRNA-Gen mit 1.500 Basenpaaren ausreichend Material für die bioinformatische Verarbeitung (PATEL, 2001). Das bakterielle 16S-rRNA-Gen setzt sich aus konstanten Sequenzen zusammen, die mit variablen Regionen durchsetzt sind. Innerhalb der variablen Abschnitte sind neun hypervariable Regionen eingeschlossen (JOHNSON & VERSALOVIC, 2012). Die konstanten Abschnitte werden als Bindungsstellen für Primer genutzt, die hypervariablen Regionen hingegen, um zwischen den Bakterientaxa unterscheiden zu können (LANE, 1991). Bakterien, die dieselbe Familienzugehörigkeit haben, gleichen sich innerhalb der hypervariablen Regionen mehr als anderen Bakterien. Diese Genabschnitte sind spezifisch für die jeweilige Bakterienspezies und können somit für phylogenetische Fragestellungen herangezogen werden (JOHNSON & VERSALOVIC, 2012). Diese Herangehensweise ermöglicht die Identifizierung von verschiedenen Bakterien (LANE, 1991; HASEGAWA & CAMARGO, 2015) und trägt dazu bei, nicht kultivierbare Bakterien nachzuweisen und sie ihrem Genus und ihrer Spezies gemäß zuzuordnen (DRANCOURT et al., 2000).

Die PCR kann auch kleinste Mengen an DNA amplifizieren (VON WINTZINGERODE et al., 1997). Im Vergleich zu der kulturellen Methode ist sie außerdem sehr schnell und sensitiv. Zudem ist es möglich, auch Mykoplasmenspezies, die nicht kultivierbar sind, aus der Nase von Katzen nachzuweisen (JOHNSON et al., 2004). Eine Studie, die das Vorkommen der Pathogene *C. felis*, *B. bronchiseptica* und *Mycoplasma felis* in Nasentupfern von Katzen mit Katzenschnupfens untersuchte, kam ebenfalls zu dem Ergebnis, dass die PCR im Vergleich zum kulturellen Nachweis eine sensitivere und günstigere Methode zur Detektion respiratorischer Pathogene bei der Katze darstellt (LITSTER et al., 2015). In einer weiteren Studie wurde das Vorkommen von *B. bronchiseptica* im oberen und unteren Respirationstrakt von Katzen mit FURTD untersucht. Die PCR wurde hierfür mit dem für *Bordetella* spp. spezifischen Flagellin-Strukturgen (*fla* A-Gen) optimiert. Dieses war bei den isolierten Bakterien zu 100 % homolog. Daraus kann geschlussfolgert werden, dass ein einziger Genotyp in der untersuchten Katzenpopulation vorherrschte. Außerdem waren die Bakterien vollständig homolog mit dem Stamm *B. bronchiseptica* und zu 99,4 % homolog mit *Bordetella parapertussis*. Diese Methode erlaubt also auch eine Differenzierung der verschiedenen *Bordetella* spp. (GARBAL et al., 2016).

Mittlerweile werden von Seiten einiger Labore Testverfahren, die auf einer PCR beruhen und gleichzeitig auf alle herkömmlichen Pathogene des Katzenschnupfens testen, angeboten. Diese PCR birgt im Vergleich zu einer kulturellen Anzucht einige Vorteile. Sie ist weniger zeitintensiv, finanziell günstiger und hinsichtlich Logistik und Transport der Proben weniger anspruchsvoll. Allerdings weist diese Methode beispielsweise hinsichtlich des Nachweises von *B. bronchiseptica* den Nachteil auf, dass sie bis zu zehnmal weniger sensitiv ist als die kulturelle Anzucht der Erreger. Zudem ist sie nicht in der Lage, weniger als 100 Pathogene pro Tupferprobe nachzuweisen (HELPS et al., 2005). Nicht außer Acht zu lassen ist auch, dass die Wahl des PCR Primers (SUZUKI & GIOVANNONI, 1996) und die damit verbundene Spezifität (WEISBURG et al., 1991) und die Sensitivität in Bezug auf die Matrizen (CHANDLER et al., 1997) die Ausbeute der PCR beeinflussen. Obwohl die Sequenzierung des 16S-rRNA-Gens für den Nachweis von Bakterien häufig gebraucht wird, gibt es einige Aspekte, die eine Verzerrung der Ergebnisse herbeiführen und somit die Aussagekraft einschränken können. An vorderster Stelle ist hier anzumerken, dass die Anzahl der

Kopien des 16S-rRNA-Gens variiert (KLAPPENBACH et al., 2001), oftmals sogar innerhalb einer Bakterienspezies (ACINAS et al., 2004). Andererseits weisen einige Bakterien bezüglich des 16S-rRNA-Gens einen hohen Grad an Homologie auf, was dazu führt, dass eine Identifikation auf Speziesebene nicht möglich ist (MIGNARD & FLANDROIS, 2006).

Auch die Auswahl der Primer kann das Ergebnis beeinflussen. Der Grund hierfür ist, dass diese nicht gleichermaßen, sondern abhängig vom jeweiligen Primer bevorzugt an die DNA bestimmter taxonomischer Gruppen binden (BERGMANN et al., 2011). Daraus kann eine Selektion oder Unterrepräsentation von Bakterienspezies resultieren (KLINDWORTH et al., 2013). Die Auswahl der zu amplifizierenden hypervariablen Regionen durch die Primer spielt ebenfalls eine Rolle. Die hypervariablen Regionen unterscheiden sich in ihrer Fähigkeit, verschiedene Bakterienspezies voneinander zu trennen. Je nach untersuchter Region können somit unterschiedliche dominierende Taxa auftreten (CLAEISSON et al., 2010; KIM et al., 2011).

#### **4.2.2. Genomsequenzierung**

Die Sequenzierung des Genoms ist mittlerweile eine gängige Methode, um die bakterielle Diversität des Respirationstrakts zu untersuchen, was sich an ihrem Einsatz in zahlreichen Studien manifestiert (RAMAKRISHNAN et al., 2013; BASSIS et al., 2014; CHOI et al., 2014a; WHELAN et al., 2014; HAUSER et al., 2016).

##### **4.2.2.1. 16S-rRNA-Amplikon-Sequenzierung**

Die Effektivität der 16S-basierten Verfahren nahm mit erhöhten Durchsatzraten der Sequenzierungsmethode zu (SEGATA et al., 2013). Die Genomsequenzierung der 16S-rRNA beruht auf dem Prinzip, die Desoxyribonukleinsäure (DNA) innerhalb der hypervariablen Regionen des 16S-rRNA-Gens zu sequenzieren. Die mittels PCR erhaltenen 16S-rRNA-Amplifikate werden anschließend mit Hilfe der Next-Generation-Sequencing-Technologie (NGS-Technologie) sequenziert. Bei dieser Hochdurchsatz-Sequenzierungsmethode werden aus einer Probe parallel mehrere Millionen Sequenzen angefertigt (TOROK & PEACOCK, 2012). Die erhaltenen Sequenzen erfordern eine Auswertung durch softwaregestützte Bioinformatik. Hierbei werden Sequenzen von niedriger Qualität verworfen und aussagekräftige Gruppen oder Cluster von Sequenzen, sogenannte OTUs gebildet. Die

Zusammenfassung von Bakterien zu einer OTU liegt am häufigsten bei der gewählten Grenze einer Übereinstimmung der Sequenzen von 97 % (WEESE et al., 2015). Eine repräsentative Sequenz jeder einzelnen OTU wird mit Sequenzen, die in einer öffentlich zugängigen 16S-rRNA Datenbank auffindbar sind, verglichen. Wenn möglich, werden den OTUs bei Übereinstimmung der taxonomischen Abstammung Genus, Familie oder höhere Taxa zugeordnet. Zu bedenken ist hierbei, dass OTUs streng genommen keine taxonomischen Einheiten sind. OTUs werden zunächst ohne Referenzdatenbanken erzeugt und stimmen oftmals nicht mit der eigentlichen Spezies oder dem Genus überein. Somit können einerseits verschiedene OTUs zur selben Spezies oder aber auch Sequenzen einer OTU zu verschiedenen Spezies gehören (SCHLOSS & WESTCOTT, 2011).

Bei der Genomsequenzierung lassen sich hunderte Proben gleichzeitig kostengünstig untersuchen, sowohl einzeln als auch in Gruppen (METZKER, 2010). Auf der Grundlage dieser Methode können Pathogene identifiziert werden, aber auch epidemiologische Untersuchungen durchgeführt werden oder solche, die auf der bakteriellen Vielfalt basieren. Sie stellt somit eine sehr leistungsfähige Methodik in der bakteriellen Diagnostik dar (DOWD et al., 2008).

Insbesondere bei Untersuchungen des respiratorischen Mikrobioms ist jedoch zu beachten, dass die Bakterienkonzentration in Abhängigkeit von der jeweiligen Körperregion variiert. Sie weist beim Menschen beispielsweise  $10^{11}$ – $10^{12}$  Bakterien pro Gramm Stuhl (SALONEN et al., 2010), aber nur  $10^4$ – $10^5$  Bakterien pro Quadratzentimeter im Nasopharynx (BOGAERT et al., 2011) auf. Es wurde nachgewiesen, dass der DNA-Gehalt der Proben Einfluss auf die Ergebnisse von Mikrobiomstudien hat. Die zunehmende Verdünnung von Probenmaterial einhergehend mit einer niedrigen Bakterienkonzentration hat einen Einfluss auf den DNA-Gehalt, der späteren Genomanalysen zur Verfügung steht. Diese These wurde von einer Studie bekräftigt, die zeigte, dass mit zunehmender Verdünnung des Probenmaterials aus dem oberen Atemtrakt von gesunden Menschen seltenere Bakterienspezies überrepräsentiert waren. Auch die relative Häufigkeit von Bakterientaxa wurde hiervon beeinflusst, Proteobacteria wurden beispielsweise vermehrt nachgewiesen, wohingegen Bacteroidetes bei niedrigerer Bakterienkonzentration seltener detektiert werden konnten. Die exakte Analyse von vergleichsweise dünn besiedelten Kompartimenten wie der Nase beziehungsweise Proben mit niedrigem Bakteriengehalt kann somit schwierig sein (BIESBROEK et



al., 2012).

Die Grenzen der Sequenzierung liegen unter anderem auch darin, dass bei der Sequenzierung einer komplexen Gemeinschaft an Mikroorganismen häufig nur ein kleiner Teil der tatsächlich vorhandenen Gemeinschaft aufgezeigt wird. Die Ursache hierfür ist unter anderem darin zu suchen, dass das zahlreiche Vorkommen bisher unbekannter Zusammenstellungen der mikrobiellen Gemeinschaft es erschwert, den Umfang der Bakterien zu erfassen (DESAI et al., 2012). Andere Studien belegen, dass auch die Genomsequenzierung fehleranfällig ist. Artefakte während der Sequenzierung können dazu führen, dass die bakterielle Vielfalt höher (KUNIN et al., 2010) oder falsch (SCHLOSS et al., 2011) eingeordnet wird. Auch die vorausgegangene PCR kann Ursache für Fehler wie Chimärenbildung sein (SCHLOSS et al., 2011). Andere Autoren gehen sogar davon aus, dass etwa 5 % der 16S-rRNA-Sequenzen in Gendatenbanken fehlerhaft sind (ASHELFORD et al., 2005).

#### **4.2.2.2. Metagenom-Shotgun-Sequenzierung**

Neben der Amplikon-basierten 16S-rRNA-Sequenzierung wird für die Analyse des Mikrobioms häufig die Metagenom-Shotgun-Sequenzierung herangezogen. Hierbei wird anstelle eines einzigen Gens beziehungsweise Genabschnitts die gesamte DNA einer Probe sequenziert. Die bei der DNA-Extraktion erhaltene DNA wird fragmentiert, und auf die PCR-Amplifikation wird verzichtet. Somit basiert die Sequenzierung des Metagenoms nicht auf dem 16S-rRNA-Gen, sondern auf der Analyse aller in einem Habitat gefundenen Gene (TRINGE & HUGENHOLTZ, 2008; THOMAS et al., 2012).

Bei der Untersuchung des Metagenoms wird die DNA einer vollständigen Gemeinschaft berücksichtigt und in kurzen Abschnitten abgelesen. Die erhaltenen Sequenzen werden in einen Referenzkatalog mikrobieller Gene oder Genome archiviert. Somit können Bakterien auf Spezieslevel identifiziert und funktionelle Genome ausfindig gemacht werden (KANEHISA et al., 2014). Folglich kann es auch Rückschlüsse auf die funktionellen Eigenschaften zulassen und nicht nur auf die phylogenetische Zusammensetzung. Dies ermöglicht es, Wissen über Struktur und Funktion der mikrobiellen Gemeinschaften und ihrer Genome zu erhalten (QIN et al., 2010) oder Organismen und metabolische Funktionen miteinander zu vergleichen (MCHARDY et al., 2007). Darüber hinaus ergibt sich die Möglichkeit,

menschliche Erkrankungen voneinander abzugrenzen (GREENBLUM et al., 2012) und Antibiotikaresistenzgene zu identifizieren (HU et al., 2013). Mit Hilfe der Metagenom-Shotgun-Sequenzierung kann außerdem neben der Untersuchung des Bakterienvorkommens auch die Detektion von Viren, Pilzen, Phagen und Parasiten vorgenommen werden (PALLEN, 2014).

Die Limitationen der Forschung in der Metagenomik beinhalten bis dato, dass aufgrund der Sequenzierung des gesamten DNA-Gehaltes einer Probe viele erhaltene Sequenzen keine nutzbaren Informationen enthalten (WANG et al., 2015). Zudem erschweren fehlende Referenzen in der Datenbank die Zuordnung der Sequenzen zu bakteriellen Taxa und Funktionen (SHARPTON, 2014). Mittlerweile ist oftmals nicht mehr die Sequenzierung der DNA der limitierende Faktor im Bereich der Forschung, sondern vielmehr die darauf folgende Analyse und Interpretation der Daten (DESAI et al., 2012).

### **III. VERÖFFENTLICHUNG**

#### **Bacterial Microbiome in the Nose of Healthy Cats and in Cats with Nasal Disease**

Elisabeth S. Dorn<sup>1</sup>, Barbara Tress<sup>1</sup>, Jan S. Suchodolski<sup>2</sup>, Tariq Nisar<sup>2</sup>,  
Prajesh Ravindran<sup>2</sup>, Karin Weber<sup>1</sup>, Katrin Hartmann<sup>1</sup>, Bianka S. Schulz<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Clinic of Small Animal Medicine, LMU University of Munich, Munich,  
Germany

<sup>2</sup>Gastrointestinal Laboratory, Department of Small Animal Clinical Sciences,  
College of Veterinary Medicine and Biomedical Sciences, Texas A&M  
University, College Station, Texas, USA

Online veröffentlicht in „PLoS ONE“ am 29.06.2017

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0180299>

## Abstract

**Background:** Traditionally, changes in the microbial population of the nose have been assessed using conventional culture techniques. Sequencing of bacterial 16S rRNA genes demonstrated that the human nose is inhabited by a rich and diverse bacterial microbiome that cannot be detected using culture-based methods. The goal of this study was to describe the nasal microbiome of healthy cats, cats with nasal neoplasia, and cats with feline upper respiratory tract disease (FURTD).

**Methodology/Principal Findings:** DNA was extracted from nasal swabs of healthy cats (n=28), cats with nasal neoplasia (n=16), and cats with FURTD (n=15), and 16S rRNA genes were sequenced. High species richness was observed in all samples. Rarefaction analysis revealed that healthy cats living indoors had greater species richness (observed species  $p=0.042$ ) and Shannon diversity ( $p=0.003$ ) compared with healthy cats living outdoors. Higher species richness (observed species  $p=0.001$ ) and Shannon diversity ( $p<0.001$ ) were found in middle-aged cats in comparison to healthy cats in different age groups. Principal coordinate analysis revealed separate clustering based on similarities in bacterial molecular phylogenetic trees of 16S rRNA genes for indoor and outdoor cats. In all groups examined, the most abundant phyla identified were Proteobacteria, Firmicutes, and Bacteroidetes. At the genus level, 375 operational taxonomic units (OTUs) were identified. In healthy cats and cats with FURTD, *Moraxella* spp. was the most common genus, while it was unclassified *Bradyrhizobiaceae* in cats with nasal neoplasia. High individual variability was observed.

**Conclusion:** This study demonstrates that the nose of cats is inhabited by much more variable and diverse microbial communities than previously shown. Future research in this field might help to develop new diagnostic tools to easily identify nasal microbial changes, relate them to certain disease processes, and help clinicians in the decision process of antibiotic selection for individual patients.

## Introduction

Microorganisms, including bacteria, fungi, and viruses, colonize the entire body. To understand their complex community structure, biology, and ecology, analyses of the microbial diversity of the body are important [1]. The microbiome is defined as the collection of microbes and their genomes, such as bacteria, archaea, viruses, and fungi, which can be either symbiotic, pathogenic, or commensal [2]. In humans, a subject's microbiome is personalized but dynamic throughout the first year of life [3]. The microbiome is a metabolically active organ with the potential to influence both the physiology and phenotype of the host [4]. Most interactions between humans and their microorganisms are not disease-related [5], and instead most microorganisms live in a symbiotic relationship with their host [6]. It is known that the microbiome supports the stimulation, development, and modulation of the immune system [7]. Furthermore, it influences the structure of the mucosa and skin and prevents its host from being colonized by potentially pathogenic microorganisms [8]. However, an imbalance of the microbiome can result in damage to its host [9]. In the last decade, a number of studies have reported compositional alterations in the microbiome of the nose of healthy and diseased humans [10-28]. The development [29-31] and influence of environmental factors [32, 33] on the nasal microbiome during childhood and changes in the nasal microbiome during aging [34, 35] have also been the subject of different studies.

Changes in the microbial populations in the nose of animals have traditionally been evaluated using conventional microbiological techniques such as culture and biochemical methods [36]. Recent molecular-based methods, most commonly targeting the 16S rRNA gene, have enabled researchers to characterize highly complex microbial communities in different sites of the human body [37-39]. In small animal medicine, most of our knowledge about the microbiome is based on analyses of 16S rRNAs from the gastrointestinal tract [40]. In contrast, very little information is available for the respiratory tracts of dogs [41] and cats [42]. The upper and lower airways are in permanent contact with the external environment during respiration and are therefore considered to be inhabited by mucosal commensals in healthy animals [43].

This study was designed to examine the microbiomes of healthy cats, cats with nasal neoplasia, and cats with feline upper respiratory tract disease (FURTD) using next-

generation sequencing techniques. Furthermore, the influence of different individuals or environmental factors on the feline nasal microbiome of healthy cats was evaluated.

## **Materials and Methods**

### **Study population and inclusion criteria**

This study was approved by the ethics committee of the Center for Clinical Veterinary Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, LMU Munich, and has been assigned number 25-30-04-2014. Healthy cats (n=28), cats with nasal neoplasia (n=16), and cats with FURTD (n=15) were included in the study. All samples were obtained from the federal state of Bavaria, southern Germany, between November 2014 and September 2015. Information regarding breed, age, sex, vaccination status, inside/outside status, duration of clinical signs, additional diseases, and current therapy were documented. A general physical examination and specific examination of the respiratory tract were performed in each cat. Patients were divided into different age groups (group 1: 0–0.3 years, group 2: >0.3–1.0 years, group 3: >1.0–5.0 years, group 4: >5.0–10.0 years, group 5: >10.0 years).

Healthy cats had to be clinically healthy for 6 months prior to sampling and had not been treated with antibiotics, anti-inflammatory, or immunosuppressive drugs during the last 6 months according to the exclusion criteria from the NIH Human Microbiome Project [44]. Healthy cats younger than 1 year were only included for comparison of age-related statistics because different human studies [3] and a longitudinal study on pigs [43] showed significant dynamic changes in the nasal microbiome in early life. Furthermore, a longitudinal study examining the fecal microbiome of cats younger than 1 year revealed higher structural and functional diversity of the microbiome later in life [45].

Cats with nasal neoplasia were eligible to enter the study if the histopathology of nasal biopsy samples confirmed malignancy. Cats with a history of antibiotic pretreatment were only included for comparison to pretreated and untreated animals because human studies showed alterations of the microbiome in individuals who received antibiotic treatment [46–48].

Cats with FURTD were eligible to enter the study if they had at least one clinical sign associated with FURTD, including nasal discharge, sneezing, ulceration of the

tongue, conjunctivitis, ocular discharge, keratitis, and corneal ulcers. Only cats with an acute history of FURTD of less than 4 weeks were included. Furthermore, the cats had to test positive for at least 1 pathogen associated with FURTD, including feline herpesvirus-1 (FHV-1), feline calicivirus (FCV), or *Chlamydia felis* (*C. felis*). The cats had not been treated with antibiotic, anti-inflammatory, or immunosuppressive drugs during the prior 6 months. None of the cats involved in the study had received intranasal vaccines, which were an exclusion criterion.

### **Patient population**

The ages of the healthy cats (Table 1) ranged from 6.0 months to 14.0 years (median 4.0 years). The median weight was 3.5 kg (1.3 kg to 7.5 kg). Healthy cats were either client-owned (n=19), from animal shelters (n=6) or farm cats (n=3).

**Table 1. Characteristics and environmental factors for the healthy cats enrolled in the study.**

DSH: Domestic Shorthair, R-Mix: Ragdoll mix, BSH-Mix: British Shorthair mix, BE: Bengal; OSH: Oriental Shorthair; age groups: group 1: 0-0.3 years, group 2: >0.3-1 year, group 3: >1-5 years, group 4: >5-10 years, group 5: >10 years; M: male, CM: male castrated, F: female, SF: female spayed; W: sampled without anesthesia, A: sampled during anesthesia; I: indoor, O: outdoor, I+B: indoor with access to a balcony (indoor), S: shelter (indoor), F: farm (outdoor); relation: related cats were assigned the same number; house: cats housed together were assigned the same number.

population	breed	age (years)	age group	sex	anesthesia	indoor/ outdoor	environment	relation	house
cat1	DSH	4.0	3	SF	W	I	I	-	-
cat2	DSH	3.0	3	CM	W	I	I+B	-	1
cat3	R-Mix	2.0	3	SF	W	I	I+B	-	1
cat4	DSH	5.7	4	SF	W	O	O	1	2
cat5	DSH	6.6	4	F	W	O	O	1	2
cat6	DSH	4.7	4	CM	W	O	O	1	2
cat7	DSH	2.6	3	F	W	O	O	1	2
cat8	DSH	10.0	5	SF	W	O	O	-	-
cat9	BSH-Mix	5.0	4	CM	W	I	I	2	3
cat10	BSH-Mix	5.0	4	SF	W	I	I	2	3
cat11	BE	4.0	3	SF	W	I	I+B	-	-
cat12	DSH	5.7	4	CM	W	O	O	1	4
cat13	DSH	14.0	5	SF	W	O	O	-	4
cat14	DSH	0.7	2	M	A	O	F	3	5
cat15	DSH	0.7	2	F	A	O	F	3	5
cat16	DSH	7.0	4	SF	W	O	O	4	6
cat17	DSH	7.0	4	CM	W	O	O	4	6
cat18	DSH	6.0	4	SF	W	O	O	-	-
cat19	DSH	2.0	3	CM	W	I	I+B	5	7
cat20	DSH	2.0	3	CM	W	I	I+B	5	7



population	breed	age (years)	age group	sex	anesthesia	indoor/ outdoor	environment	relation	house
cat21	DSH	1.0	3	F	A	I	S	-	8
cat22	DSH	8.0	4	SF	A	I	S	-	-
cat23	DSH	1.5	3	F	A	I	S	-	9
cat24	DSH	2.8	3	F	A	I	S	-	9
cat25	OSH	6.0	4	SF	A	I	S	-	8
cat26	DSH	1.5	3	F	A	I	S	-	8
cat27	DSH	0.5	2	M	W	O	F	-	-
cat28	DSH	3.0	3	CM	W	I	I	-	-

The age of the cats with nasal neoplasia (Table 2) ranged from 3.5 years to 20.5 years (median 10.4 years), and the median weight was 4.1 kg (2.2 kg to 7.8 kg). All cats were sampled during anesthesia for diagnostic work-up at the Clinic of Small Animal Medicine of the LMU University of Munich.

**Table 2. Characteristics and pretreatment of cats with nasal neoplasia enrolled in the study.**

DSH: Domestic Shorthair, B: Birman, L: Domestic Longhair, MC: Maine Coon; age groups: group 1: 0-0.3 years, group 2: >0.3-1 year, group 3: >1-5 years, group 4: >5-10 years, group 5: >10 years; M: male, CM: male castrated, F: female, SF: female spayed; N: no treatment for at least 3 months prior sampling, Y: yes, Y/T: yes and currently under treatment; SCC: squamous cell carcinoma, L: lymphoma, F: fibrosarcoma, C: carcinoma, AD: adenocarcinoma.

population	breed	age (years)	age group	sex	histopathology	antibiotics	steroids
cat29	B	10.0	5	CM	L	Y	Y
cat30	L	12.0	5	F	SCC	N	N
cat31	DSH	12.0	5	CM	L	Y	Y
cat32	DSH	8.0	4	CM	L	Y	Y/T
cat33	DSH	7.0	4	CM	L	N	Y/T
cat34	DSH	14.0	5	CM	F	N	N
cat35	DSH	9.0	4	SF	L	Y/T	Y/T
cat36	DSH	17.0	5	CM	L	Y	N
cat37	MC	5.0	4	CM	SCC	N	Y
cat38	DSH	3.5	3	F	SCC	N	N
cat39	B	10.7	5	F	AD	Y/T	Y
cat40	DSH	7.6	4	F	SCC	Y	N
cat41	DSH	20.5	5	SF	C	N	N
cat42	DSH	12.2	5	SF	SCC	Y	Y
cat43	DSH	12.7	5	CM	AD	Y/T	N
cat44	DSH	8.3	4	CM	L	N	N

The age of the cats with FURTD (Table 3) ranged from 1.0 month to 6.6 years (median 0.3 years), and their median weight was 1.2 kg (0.3 kg to 4.0 kg). All cats were client-owned and sampled without anesthesia.

**Table 3. Characteristics and infection status of cats with FURTD enrolled in the study**

DSH: Domestic Shorthair, T: Toyger; age groups: group 1: 0-0.3 years, group 2: >0.3-1 year, group 3: >1-5 years, group 4: >5-10 years, group 5: >10 years; M: male, CM: male castrated, F: female, SF: female spayed.

population	breed	age (years)	age group	sex	pathogens
cat45	T	1.0	3	F	FHV
cat46	DSH	4.0	3	SF	FHV
cat47	DSH	6.6	4	F	FCV
cat48	DSH	0.1	1	M	FCV
cat49	DSH	0.2	1	M	FCV, <i>C. felis</i>
cat50	DSH	0.2	1	M	FHV
cat51	DSH	0.3	2	F	FCV
cat55	DSH	0.2	1	M	<i>C. felis</i>
cat56	DSH	0.2	1	F	<i>C. felis</i>
cat57	DSH	0.3	2	F	<i>C. felis</i>
cat58	DSH	0.2	1	M	<i>C. felis</i>
cat59	DSH	0.2	1	F	<i>C. felis</i>
cat60	DSH	0.4	2	F	<i>C. felis</i>
cat61	DSH	0.4	2	F	<i>C. felis</i>
cat62	DSH	0.5	2	M	FCV

### Sampling technique

Two dry sterile swabs consisting of short nylon fibers (Copan®, FLOQSwabs™, Brescia, Italy) were collected per cat, 1 from each nostril. The samples were obtained by gently inserting and rotating the swab into the cranial aspects of the nasal cavity. Samples were stored at -80°C until analyses were performed. One additional sterile dry rayon swab (Copan® sterile dry swab 155C, Brescia, Italy) was obtained from the cats with FURTD from the conjunctiva, nares, pharynx, and tongue, and submitted for viral testing (IDEXX laboratories, Ludwigsburg, Germany).

### DNA isolation

Total nucleic acid (DNA) isolation using the QIAamp® DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) was performed according to the manufacturer's instructions and as described previously [49]. Samples from the left and right nostril of each cat

were pooled. The swabs were placed in a 2-ml tube filled with phosphate-buffered saline (PBS) supplemented with 0.1% NaN<sub>3</sub> as a fungicide. The samples were incubated at room temperature for 3 hours. The swabs were removed from the tubes, and the remaining buffer solution was centrifuged (Eppendorf Centrifuge 5417R, Hamburg, Germany) for 10 minutes at 7,500 rpm. After centrifugation, the supernatant was removed, and the pellet was resuspended in 180 µl of buffer ATL. After addition of 20 µl proteinase K, the sample was mixed by vortexing and incubated in a 1.5-ml reaction tube at 56°C (Eppendorf Thermomixer comfort, Hamburg, Germany) for 1 hour. The tube was briefly centrifuged at 7,500 rpm, followed by the addition of 200 µl buffer AL and vortexing. The tube was incubated at 70°C for 10 minutes and briefly centrifuged. Afterwards, 200 µl ethanol was added, and the tube was vortexed and briefly centrifuged. The mixture was applied to the QIAamp Mini spin column and centrifuged at 800 rpm for 1 minute. Samples from both nostrils of each cat were pooled, placed on the same QIAamp Mini spin column and briefly centrifuged. The QIAamp Mini spin was placed in a sterile 2-ml collection tube and centrifuged briefly. DNA was washed by adding 500 µl Buffer AW1, centrifuging at 8,000 rpm for one minute, and transferring the sample to a new 2-ml collection tube. Next, 500 µl buffer AW2 was added, and the tube was centrifuged at 14,000 rpm for 3 minutes. The QIAamp Mini spin column was placed in a new 1.5-ml microcentrifuge tube followed by the addition of 100 µl buffer AE, and the sample was incubated at room temperature for 5 minutes. The QIAamp Mini spin column was centrifuged at 8,000 rpm for 1 minute. As a negative control, the same procedure was performed using sterile water with and without an unused swab. The extracted DNA was stored at - 80°C until further analysis.

### **DNA sequencing**

Sequencing based upon the V4 region of the 16S rRNA gene was performed on an Illumina MiSeq instrument (Illumina Inc.; San Diego CA, USA) at the MR DNA Laboratory (Shallowater, TX, USA) as described previously, with forward primer 515 and reverse primer 806 [50, 51]. Raw sequence data were screened, trimmed, filtered, denoised, and chimera-depleted with default settings using QIIME pipeline version 1.8 software (<http://qiime.sourceforge.net>) [52] and UCHIME (<http://www.drive5.com/uchime>) [53]. Operational taxonomic units were defined as bacterial sequences with at least 97% similarity to representative sequences from

the Greengenes v 13.8 database [54]. Sequences were clustered into OTUs by using an open reference approach in QIIME [54]. All sequences from all samples were clustered into operational taxonomic units (OTUs), which is based on sequence similarity within the reads. Accordingly, OTUs in QIIME are clusters of sequences that represent some degree of taxonomic relatedness. For example, when sequences are clustered at 97% sequence similarity, each resulting cluster is typically thought of as representing a genus. These current techniques for selecting OTUs are known not to concur with the original term “species.”. In this context, the “observed species” metric is the number of unique OTUs found in the samples [52]. Data were uploaded to the database of the National Center for Biotechnology Information (NCBI) (accession number SRP074617).

### **Data analysis**

A total of 4,760,303 sequences (median 73,763; mean 74,380; range 25,641-126,171) were amplified. All samples were rarefied to an equal depth of 25,640 sequences per sample. Data were used to define the relative percentages of bacteria for each individual sample. The alpha and beta diversity were measured, and principal coordinates analysis (PCoA) plots and rarefaction curves were created using QIIME v1.8 software (Knight and Caporaso Labs, Arizona, USA). Weighted and unweighted UniFrac analyses were performed. Differences in microbial communities between the groups were investigated by analysis of similarity (ANOSIM) calculated for unweighted and weighted UniFrac distances using the PRIMER 6 statistical software package (PRIMER-E Ltd., Luton, UK). P-values <0.05 were considered statistically significant.

Assumption of normality was tested using the D’Agostino and Pearson normality test (Prism v.7.0, Graph-Pad Software Inc., CA, USA). As most datasets did not meet the assumptions of a normal distribution, differences in the proportions of bacterial taxa (defined as percentage of total sequences) between groups were determined using the nonparametric Kruskal–Wallis test or for comparison of only 2 groups the Mann-Whitney test (Prism v7.0, Graph-Pad Software Inc., CA, USA). The resulting p-values were adjusted for multiple comparisons using the Benjamini Hochberg’s false discovery rate (FDR). Dunn’s multiple comparison test was used to determine which of these groups were significantly different when age groups and environment was compared. The phylogeny-based UniFrac distance metric analysis was used to investigate differences in microbial communities between

groups [54]. Linear discriminant analysis (LDA) effect size (LEfSe) was utilized to evaluate differentially abundant bacterial taxa and predicted function among the animal groups. This analysis was performed online (<https://huttenhower.sph.harvard.edu/galaxy/>).

## **Results**

### **Study population**

Healthy cats younger than 1 year ( $n=3$ ) were excluded for all investigations other than those that examined the effect of age on the microbiome. When excluding healthy cats younger than 1 year, the age of healthy adult indoor (median 3.0 years) and outdoor cats (median 5.7 years) was significantly different ( $p=0.002$ ). Another significant difference ( $p<0.001$ ) was observed when comparing the age of healthy cats (median 4.0 years) and cats with FURTD (median 0.3 years), and those with nasal neoplasia that did not receive antibiotics (median 8.3 years) and cats with FURTD. However, there were no significant differences regarding age when healthy cats and cats with nasal neoplasia were compared according to Dunn's multiple comparison test.

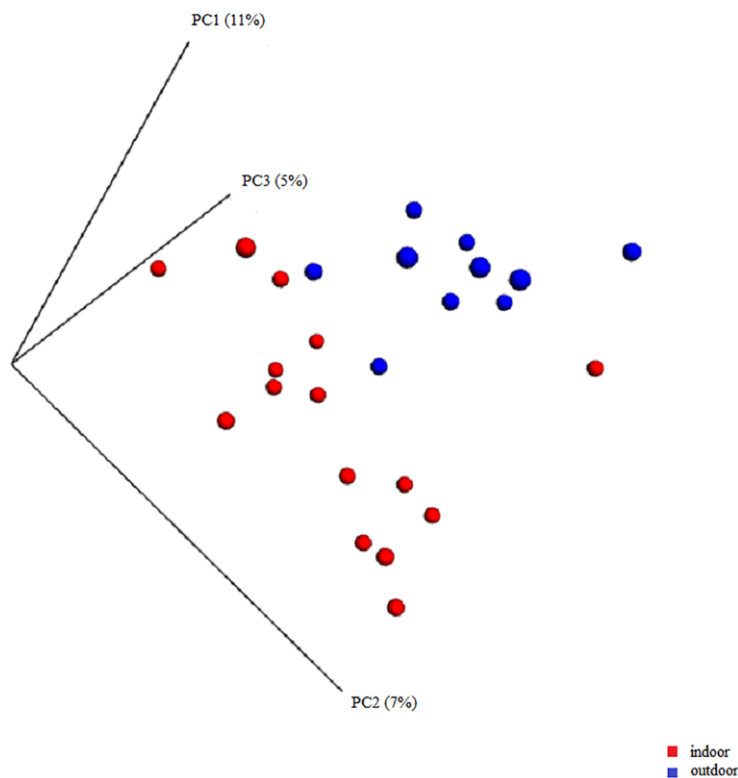
### **Nasal microbial composition**

The following factors were considered in the analysis of nasal microbial composition of healthy cats: the influence of age (age groups 1-5), environment (indoor/outdoor), group housing, familial relationship between cats, and sampling with or without anesthesia. When all types of environments, such as indoor, indoor and balcony, shelter, and outdoor (ANOSIM on unweighted UniFrac distance  $p=0.003$  and on weighted UniFrac distance  $p=0.001$ ), just indoor and outdoor (ANOSIM on unweighted UniFrac distance  $p=0.001$  and on weighted UniFrac distance  $p=0.015$ ) and different age groups (ANOSIM on unweighted UniFrac distance  $p=0.002$  and on weighted UniFrac distance  $p=0.048$ ) were compared, these groups were significantly different. Pairwise testing using PRIMER6 indicated that cats living indoors with access to a balcony had a significantly different microbial community composition ( $p=0.005$ ) in comparison to outdoor cats. The same accounted for the beta diversity of indoor (which includes indoor, indoor with access to a balcony and shelter) compared with outdoor cats ( $p=0.004$ ). Principal coordinate analysis plots were constructed using the unweighted UniFrac metric to evaluate similarities in microbial communities defined as clustering by visual

assessment. A large degree of variability was seen across all samples. Clustering in healthy cats was only observed for age groups and for different indoor/outdoor status (Fig 1). ANOSIM analysis based on unweighted and weighted UniFrac metrics did not detect a significant difference for the following factors: anesthesia (unweighted UniFrac distance  $p=0.750$ , weighted UniFrac distance  $p=0.794$ ), same household (unweighted UniFrac distance  $p=0.126$ , weighted UniFrac distance  $p=0.2$ ) or familial relationship (unweighted UniFrac distance  $p=0.208$ , weighted UniFrac distance  $p=0.209$ ). Calculation of average distances showed no closer similarity between related cats and cats living in the same household when compared to unrelated cats and cats living in separate households.

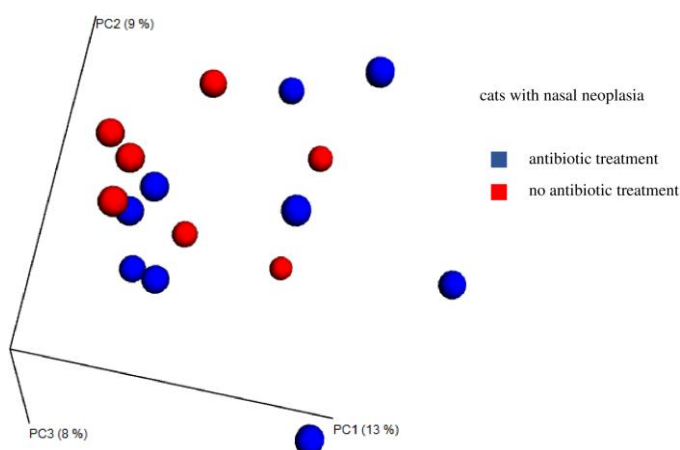
In cats with nasal neoplasia, unweighted UniFrac metric did not show a significant difference using ANOSIM analysis, when the microbiome of cats with nasal neoplasia that received antibiotics was compared to cats that did not have a history of antibiotic treatment (unweighted UniFrac distance  $p=0.465$ , weighted UniFrac distance  $p=0.159$ ). Clustering based on similarities of bacterial molecular phylogenetic trees was not observed in comparisons of pretreated and untreated cats with nasal neoplasia (Fig 2).

In cats with FURTD, beta diversity showed significant differences between cats with and without *C. felis* infection (Fig 3,  $p=0.011$ ) and in cats with and without FHV-1 infection (Fig 4,  $p=0.033$ ) for ANOSIM performed on the unweighted UniFrac distance. However, when the analysis was performed on the weighted UniFrac distance, no significant difference was observed (*C. felis*  $p=0.088$  and FHV-1  $p=0.092$ ).



**Fig 1. Principal coordinate analysis for indoor/outdoor status of healthy cats.**

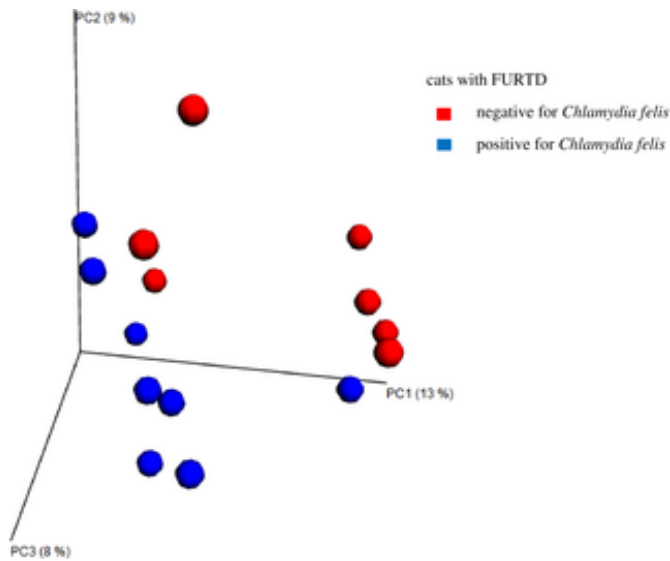
Principal coordinate analysis (PCoA) plots based on the unweighted UniFrac distance metric illustrating differences in microbial communities present in the nose of healthy cats living indoor versus outdoor. Every dot represents the bacterial community of one individual cat. A separation defined as clustering was observed in indoor and outdoor cats. PC1: first component along the x- and y-axes, PC2: second component, PC3: third component; blue dots: outdoor cats; red dots: indoor cats.



**Fig 2. Principal coordinate analysis for antibiotic treatment of cats with nasal neoplasia.**

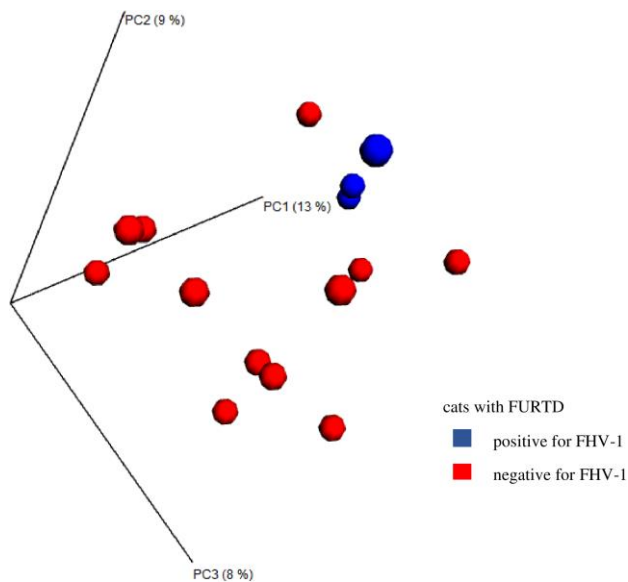
Principal coordinate analysis (PCoA) plots based on the unweighted UniFrac distance metric illustrating differences in microbial communities present in the nose of cats with nasal neoplasia. Every dot represents the bacterial community of one individual cat. A separation defined as clustering was not observed. PC1: first component along the x- and y-axes, PC2: second component, PC3: third component; blue dots: antibiotic treatment; red dots: no antibiotic treatment.





**Fig 3. Principal coordinate analysis for *Chlamydia felis* infection in cats with FURTD.**

Principal coordinate analysis (PCoA) plots based on the unweighted UniFrac distance metric illustrating differences in microbial communities present in the nose of cats with FURTD. Every dot represents the bacterial community of one individual cat. A separation defined as clustering was observed in cats according to their status of being positive or negative for *Chlamydia felis*. PC1: first component along the x- and y-axes, PC2: second component, PC3: third component; blue dots: cats that tested positive for *Chlamydia felis*; red dots: cats that tested negative for *Chlamydia felis*.



**Fig 4. Principal coordinate analysis for FHV-1 infection in cats with FURTD.**

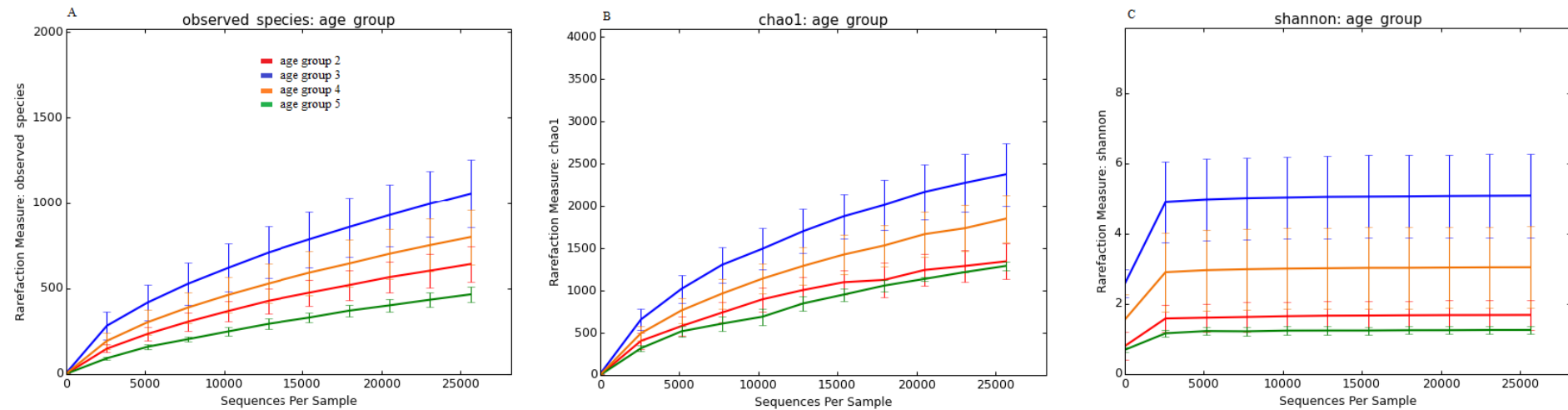
Principal coordinate analysis (PCoA) plots based on the unweighted UniFrac distance metric illustrating differences in microbial communities present in the nose of healthy cats that tested positive or negative for FHV-1. Every dot represents the bacterial community of one individual cat. A separation defined as clustering was observed. PC1: first component along the x- and y-axes, PC2: second component, PC3: third component; blue dots: cats that tested positive for FHV-1; red dots: cats that tested negative for FHV-1.

### **Species richness and diversity**

Species richness (observed species and Chao1) and alpha-diversity (Shannon) revealed high individual variability between samples collected from healthy and diseased cats (S1 Table). As explained above, the current techniques for selecting OTUs are known not to concur with the original term “species”. In this context, the “observed species” metric is the number of unique OTUs found in the sample. Species richness was significantly higher in cats of age group 3 compared with age group 2 (Fig 5,  $p=0.001$ ) when all age groups of healthy cats were compared. When 25,640 sequences per sample were analyzed, the number of observed species ranged from 1,426 to 796 for age group 3 to the lowest number of 508 to 422 for age group 5. Cats kept indoors had a significantly higher number of observed species compared with cats with access to the outside (Fig 6,  $p=0.042$ ). The number of observed species ranged from 1,426 to 935 for indoor and balcony cats and was lowest for outdoor cats with 990 to 422.

As an estimator for species richness at a higher sequencing depth, the Chao 1 index also showed significantly higher levels for age group 3 when all age groups were compared (Fig 5,  $p<0.001$ ). In comparisons of indoor/outdoor status, the Chao 1 index revealed that most indoor cats had a higher observed species number compared with outdoor cats (Fig 6,  $p=0.011$ ).

The Shannon diversity index, which takes into account the abundance and evenness of species, showed similar results concerning the number of observed species and Chao 1 index in different age groups, with age group 3 having the highest and age group 5 having the lowest diversity, and a significant difference between age group 2 and age group 3 when all age groups were compared (Fig 5,  $p<0.001$ ). Similarly, samples from indoor cats were more diverse compared with outdoor cats based on the Shannon index (Fig 6,  $p=0.003$ ).



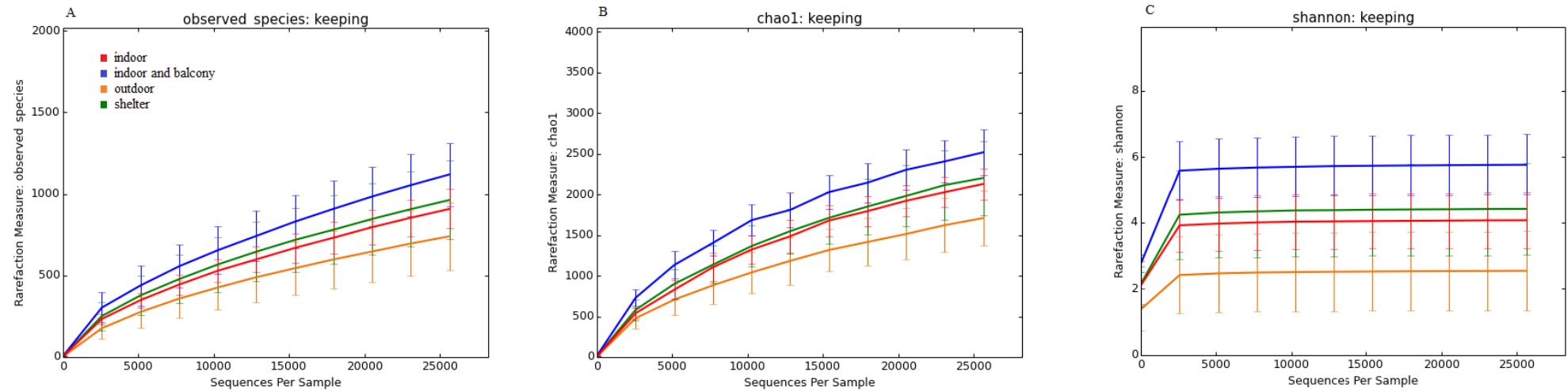
**Fig 5. Rarefaction curves of 16S rRNA gene sequences from healthy cats of different age groups.**

Lines represent the mean of each age group, and error bars represent the standard deviations.

The analysis was performed on a randomly selected subset of 25,640 sequences per sample.

(A) Observed Species. (B) Chao1 index. (C) Shannon diversity index

(age group 2: red line, age group 3: blue line, age group 4: orange line, age group 5: green line).



**Fig 6. Rarefaction curves of 16S rRNA gene sequences obtained from healthy cats living in different environments.**

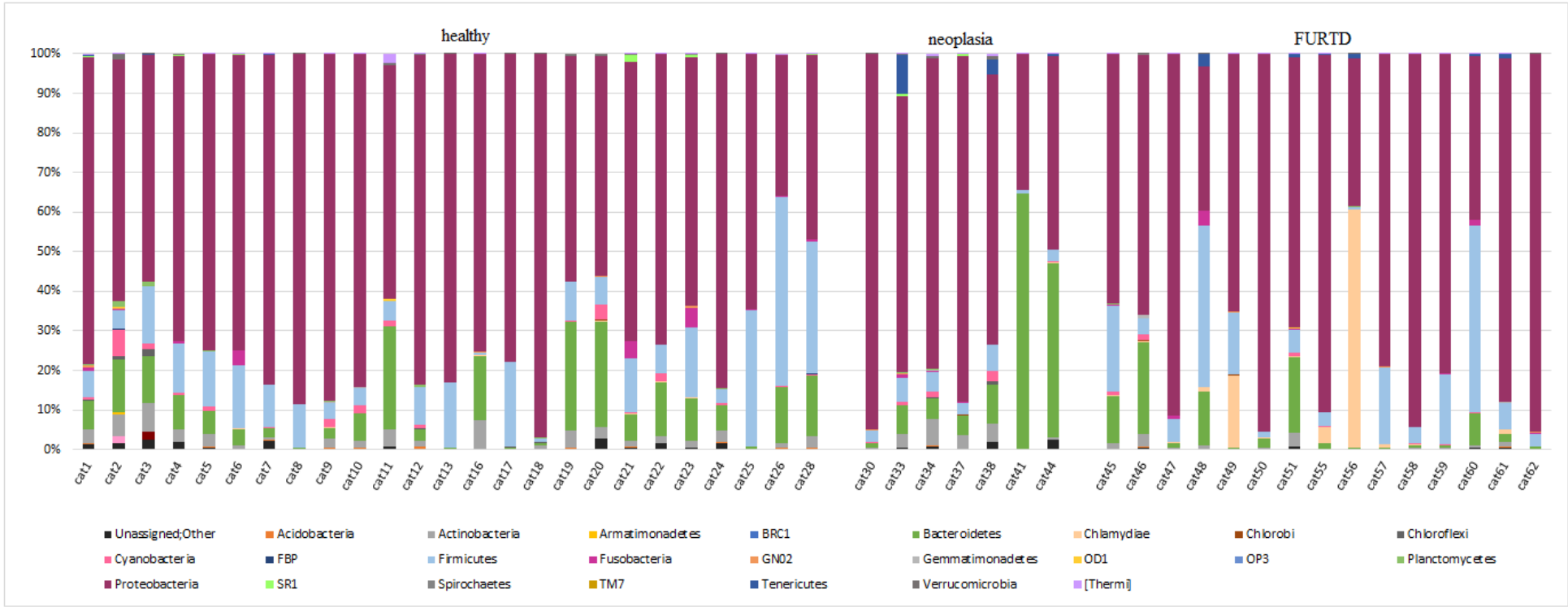
Lines represent the mean of each age group, and error bars represent the standard deviations.

(A) Observed Species. (B) Chao1 index. (C) Shannon diversity index

(cats living indoor: red line, cats living indoor with access to a balcony: blue line, cats with access to the outside: yellow line, cats living in a shelter: green line)

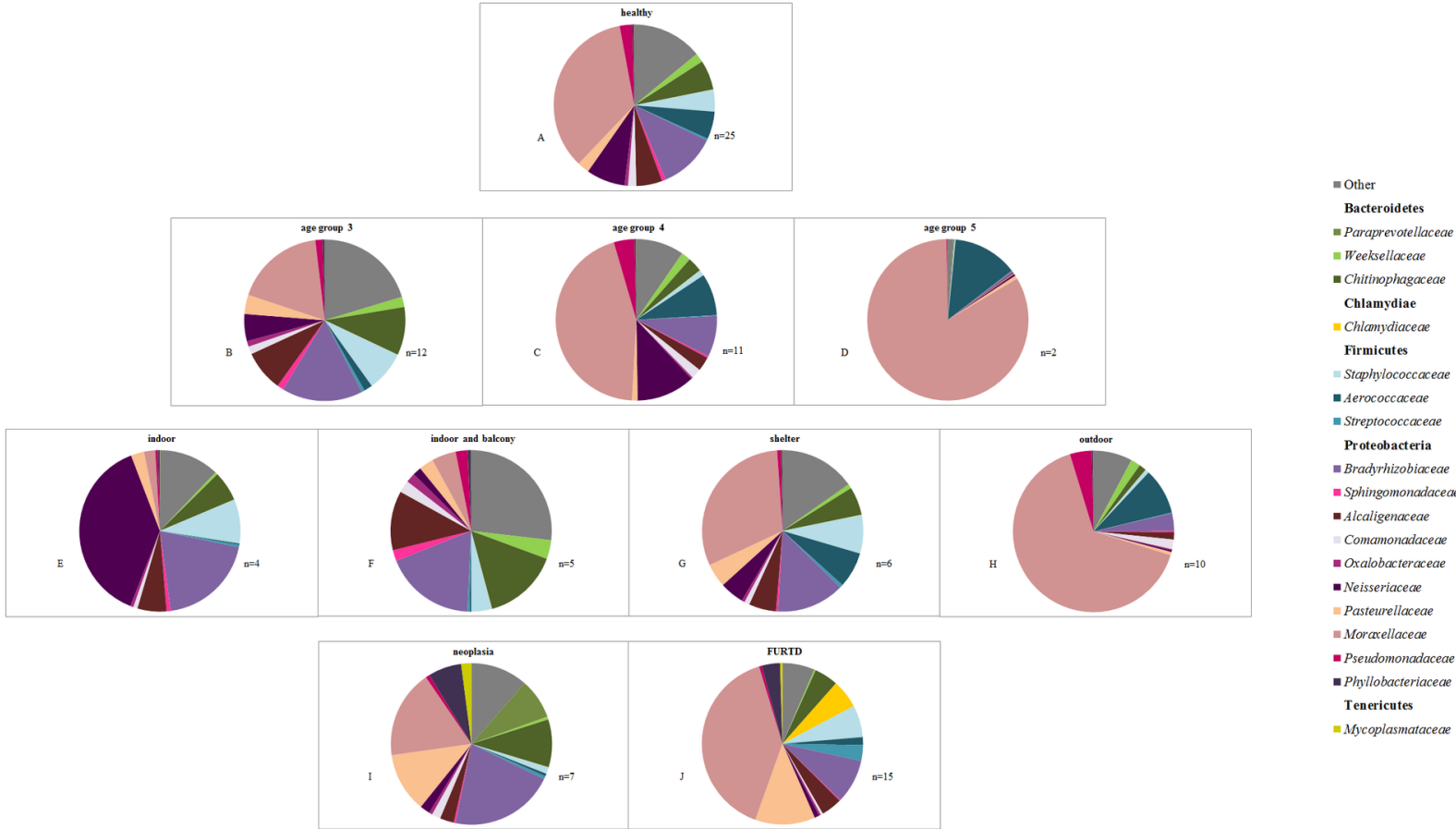
**Most common taxa colonizing the nose**

Twenty-four phyla were identified from all nasal samples. Proteobacteria were the predominant bacterial phylum in healthy and diseased cats. Proteobacteria, Bacteroidetes, and Firmicutes together represented, on average, more than 92% of the total bacteria sequenced in all three groups. At the finest taxonomic resolution possible, a total of 375 OTUs was found, but DNA could not always be resolved beyond the genus level (S2 Table). The composition of the nasal microbiome differed at an individual level (Fig 7). The predominant bacterial groups in the nose of healthy and diseased cats are displayed in Table 4 and Table 5 and Fig 8. S2 Table summarizes the proportions of bacteria by phyla, class, order, family, and genus in healthy cats, different age groups of healthy animals, healthy cats with different indoor/outdoor status and diseased cats.



**Fig 7. Composition of the nasal microbiome in healthy and diseased cats.**

Bacterial phyla in the nose of single cats enrolled in the study. Each bar chart represents one cat.



**Fig 8. Bacterial phyla and families in the nose of cats.**

The average of the most common bacterial phyla and families identified in healthy cats according to their age group or environment and in cats with FURTD and nasal neoplasia. Healthy cats: A, B, C, D, E, F, G, H.

Table 4. Relative proportions of the most abundant bacterial taxa identified by sequencing of the 16S rRNA gene.

Taxa	Healthy (n=25)		Neoplasia (n=7)		FURTD (n=15)	
	mean %	SD	mean %	SD	mean %	SD
<b>Phylum</b>						
<b>Bacteroidetes</b>	9.3	8.3	19.5	24.5	5.7	7.7
<b>Chlamydia</b>	0.1	0.0	0.0	0.0	5.7	15.7
<b>Firmicutes</b>	13.0	11.2	3.8	2.0	13.1	14.3
<b>Proteobacteria</b>	71.4	14.5	68.8	21.2	72.7	21.1
<b>Class</b>						
<b>Alphaproteobacteria</b>	15.0	12.2	29.2	17.5	13.4	13.9
<b>Betaproteobacteria</b>	15.5	17.7	7.4	5.6	6.0	7.0
<b>Gammaproteobacteria</b>	40.7	31.0	32.1	26.3	52.9	32.0
<b>Order</b>						
<b>Pseudomonadales</b>	37.5	32.7	18.5	31.1	40.4	33.3
<b>Rhizobiales</b>	12.9	10.5	28.3	16.9	12.9	13.7
<b>Family</b>						
<b><i>Bradyrhizobiaceae</i></b>	11.4	10.2	21.0	18.8	8.8	12.7
<b><i>Moraxellaceae</i></b>	34.9	33.9	17.7	31.4	39.8	33.7
<b><i>Neisseriaceae</i></b>	7.8	17.3	2.0	3.3	0.9	0.8
<b>Genus</b>						
<b><i>Moraxella</i></b>	33.0	34.2	15.8	31.8	38.6	33.8
<b>unclassified <i>Bradyrhizobiaceae</i></b>	11.3	10.1	20.6	18.4	8.8	12.6

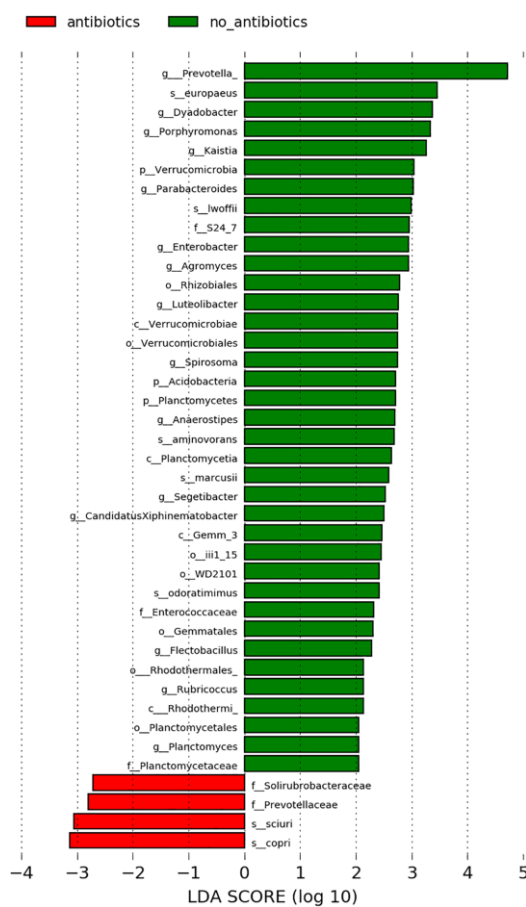


Table 5. Taxa present at &gt;1% mean relative abundance in one or more groups of cats enrolled in the study.

Phylum	Family	Genus	Healthy (n=25)		Neoplasia (n=7)		FURTD (n=15)	
			mean %	SD %	mean %	SD %	mean %	SD %
Actinobacteria	<i>Corynebacteriaceae</i>	<i>Corynebacterium</i>	0.9	1.5	1.1	1.0	0.3	0.6
Bacteroidetes	<i>[Paraprevotellaceae]</i>	<i>[Prevotella]</i>	0.1	0.1	8.0	20.2	0.1	0.2
	<i>[Weeksellaceae]</i>	<i>Cloacibacterium</i>	1.6	2.9	0.5	0.6	0.2	0.6
	<i>Chitinophagaceae</i>		0.2	0.2	7.3	14.6	0.2	0.2
		<i>Sediminibacterium</i>	5.8	6.5	2.2	1.9	4.6	6.6
Chlamydiae	<i>Chlamydiaceae</i>	<i>Chlamydia</i>	0.0	0.0	0.0	0.0	5.7	15.7
Firmicutes	<i>Staphylococcaceae</i>	<i>Staphylococcus</i>	4.3	9.3	1.3	1.3	6.3	9.1
	<i>Aerococcaceae</i>	<i>Alloiococcus</i>	5.5	8.2	0.5	0.9	1.6	1.9
	<i>Streptococcaceae</i>	<i>Streptococcus</i>	0.3	0.3	0.6	0.7	2.8	10.1
	<i>Bradyrhizobiaceae</i>		11.3	10.1	20.6	18.4	8.8	12.6
Proteobacteria	<i>Phyllobacteriaceae</i>	<i>Phyllobacterium</i>	0.4	0.3	6.6	14.0	3.7	8.1
	<i>Alcaligenaceae</i>	<i>Achromobacter</i>	4.9	5.2	2.7	2.5	4.0	5.6
	<i>Comamonadaceae</i>	<i>Lampropedia</i>	0.0	0.0	1.0	2.7	0.0	0.0
	<i>Neisseriaceae</i>	<i>other</i>	1.7	3.1	1.2	2.6	0.5	0.5
	<i>Neisseriaceae</i>		5.4	16.7	0.6	0.6	0.3	0.3
	<i>Pasteurellaceae</i>	<i>Bibersteinia</i>	1.2	1.9	5.8	7.7	4.0	3.8
		<i>Haemophilus</i>	0.1	0.1	0.2	0.2	1.6	5.3
		<i>Pasteurella</i>	0.6	0.6	5.1	8.5	5.7	14.2
	<i>Moraxellaceae</i>	<i>Acinetobacter</i>	1.1	1.2	1.4	1.4	0.5	0.6
		<i>Moraxella</i>	33.0	34.2	15.8	31.8	38.6	33.8
	<i>Pseudomonadaceae</i>	<i>Pseudomonas</i>	2.3	7.4	0.7	0.6	0.5	0.7
	<i>Xanthomonadaceae</i>		0.1	0.1	1.2	2.9	0.1	0.1
Tenericutes	<i>Mycoplasmataceae</i>	<i>Mycoplasma</i>	0.0	0.0	2.0	3.8	0.5	0.8

Similar to the difference observed in beta diversity between healthy indoor and outdoor cats, the analysis of individual bacterial groups with LEfSe showed a different abundance of taxa when these groups were compared. Indoor cats had a significantly lower relative abundance of the genus *Moraxella*, while significantly higher levels were detected in the genera *Bradyrhizobium*, *Staphylococcus*, and *Pasteurella* higher.

Within the study group with nasal neoplasia, the bacterial taxa of patients with and without antibiotic treatment prior to sampling were compared. While there were no significant differences in alpha and beta diversity, several significantly different bacterial taxa could be established using LEfSe (Fig 9). While *Prevotella copri* and *Staphylococcus sciuri* were significantly more abundant in cats that had received antibiotics within the last 8 weeks, many taxa were decreased in cats with an antibiotic history.



**Fig 9. Differentially abundant bacterial groups shown by LDA Scores based on LEfSe.**

Groups that were differentially abundant between cats with nasal neoplasia that received (red bars) or did not receive (green bars) antibiotic treatment before sampling. Taxonomic levels are represented as p\_ (phylum), c\_ (class), o\_ (order), f\_ (family), and g\_ (genus).

## Discussion

The present study demonstrates that the nasal microbiome in cats is much more diverse than previously reported using culture-based methods [55-58]. Sequence data revealed a high individual variability among the samples collected from cats. Although additional samples from more cats are needed to arrive at further conclusions, the results suggest that the composition of the bacterial community is influenced by age and different environmental factors. In humans, a subject's microbiome is personalized but includes dynamic changes throughout the first year of life characterized by a greater bacterial density and decreased diversity at a young age [3]. Similarly, the present study detected differences in the nasal microbial composition of healthy cats at different ages. Because of the strong influence of age on the nasal microbial composition, this parameter was not useful to compare healthy cats with diseased cats belonging to other age groups. In this case, differences in the microbiome could not only result from the underlying disease process but would also be affected by age. This phenomenon had to be kept in mind when interpreting the nasal microbial composition of cats with FURTD in the present study because FURTD is frequently detected in kittens younger than one year of age. In contrast, cats suffering from nasal neoplasia tend to be older. Because healthy cats had to be free from clinical signs of disease, few healthy old cats were eligible to enter the study. In the present study, the age of the healthy cats, cats with neoplasia, and cats with FURTD were significantly different. Therefore, a statistical comparison of the microbiome of cats with different disease statuses status was not performed.

In the present study, *Moraxella*, *Bradyrhizobiaceae*, *Sediminibacterium*, *Alloicoccus*, and *Neisseriaceae* were the most commonly detected bacteria in the nose of healthy cats. In cats with FURTD, *Moraxella*, *Bradyrhizobiaceae*, *Staphylococcus*, *Pasteurella*, *Chlamydia* and *Streptococcus* were the most frequently observed taxa. In previous studies using culture-based methods and PCR, the most commonly described bacteria in the nose of cats with FURTD included *Pasteurella*, *Streptococcus*, and *Staphylococcus* [57]. In addition to these bacteria, another study additionally detected *Mycoplasma* spp. as the most common bacterium in cats with FURTD [58]. Interestingly, in the present study, *Mycoplasma* was not one of the most abundant taxa in the nose of cats with FURTD concerning the relative abundance (mean 0.5%). *Chlamydia felis* (*C. felis*) is

another known pathogen that is frequently detected in cats with FURTD and has been observed in the nose of cats with FURTD [59]. Notably in this study, *C. felis* was only observed in cats with FURTD (relative abundance 5.7%). *Staphylococcus* spp., *Pasteurella* spp., and *Streptococcus* spp. were commonly detected in cats with FURTD in this study, as previously described [57, 58]. The second most abundant taxa in healthy cats and in cats with FURTD detected in this study was *Bradyrhizobiaceae*, which has never been previously described as an inhabitant of the feline nose but has recently been detected in the feline oropharynx of healthy cats [42] and in the nasal cavity of healthy dogs [41].

The most commonly identified bacterial family in healthy cats and cats with FURTD was *Moraxellaceae*. In humans, *Moraxella catarrhalis* has been cultured from the hypopharynx of neonates as a risk factor for childhood asthma [60] and bronchiolitis or pneumonia [61]. During the first year of life, *Moraxella* spp. can be more frequently detected in children with acute respiratory infections than in healthy ones [62]. In cattle, *Moraxella bovis* and *Moraxella bovoculi* have been associated with bovine keratoconjunctivitis [63], but they could also be detected in the nasopharynx of asymptomatic cattle [64]. Studies investigating the feline oral microbiota in healthy cats [65] and in cats with and without periodontitis [66] identified *Moraxella* spp. as one of the core species of the oral cavity of healthy cats using next-generation sequencing. Similarly, the family *Moraxellaceae* also seems to represent the most abundant bacterial family in the feline nasal cavity. In a study including 59 cats with FURTD, *Moraxella* spp. was detected in aerobic cultures of 4 nasal and 21 pharyngeal swabs [58].

Members of the genus of unclassified *Bradyrhizobiaceae* were abundant in the nose of cats with nasal neoplasia and could also be detected in healthy cats. To the author's knowledge, this genus has never been previously described in the feline nose. In humans, *Bradyrhizobium enterica* was found in colon biopsies of patients with cord colitis syndrome [67, 68], in the blood and lung of a patient with fatal pulmonary disease [69], and in blood samples of patients with poorly defined illness [70]. In animals, *Bradyrhizobium* could be detected in the gastrointestinal tract of the Amazonian catfish, (*Panaque nigrolineatus*) [71], yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*) [72], tropical caterpillars (Lepidoptera: Saturniidae) [73], and lagomorphs pikas (Ochotonidae) [74]. However, the role of *Bradyrhizobiaceae* in the feline upper respiratory tract and the organism's potential role in the

pathogenesis of nasal neoplasia in cats necessitate further studies.

The results of the present study indicate an abundance of *Pasteurella* spp., especially in diseased cats with nasal neoplasia or FURTD. In other studies, *Pasteurella* spp. were associated with feline gingivostomatitis [75] and have been isolated from wounds caused by cat bites [76].

Known bacterial pathogens that are frequently involved in FURTD, such as *C. felis* and *Mycoplasma* spp., were observed in diseased cats in the present study. *Mycoplasma* spp. have been detected by culture and PCR from nasal samples of healthy cats [36]. However, in most studies using culture or PCR for detection of *C. felis* and *Mycoplasma* spp. in healthy cats, conjunctiva and/or oropharyngeal region were sampled for pathogen detection [77-80]. Since the number of cats with FURTD was small in the present study, the roles of the pathogens FHV-1, FCV, and *C. felis* in the composition of the nasal microbiome during an acute phase of disease could not be assessed.

In the present study, the microbiome of healthy and diseased animals was not compared because a human [3] and a longitudinal study in pigs [43] showed significant dynamic changes in the nasal microbiome in early life as well as age-related differences in adults [35]. Furthermore, a longitudinal study examining the fecal microbiome of cats showed higher structural and functional diversity of the microbiome later in life compared with cats younger than 1 year [45].

It is often not clear which qualitative and quantitative changes in the microbiome are meaningful and whether these changes are associated with disease. Furthermore, distinguishing between cause and effect remains a challenge. It is still uncertain whether the microbiome in diseased animals is altered because of disease-related local or systemic immunosuppression or whether the altered microbiome is involved in the pathogenesis of certain diseases.

There are different interactions between the immune system and the microbiome. On the one hand, the immune system must learn to tolerate commensal bacteria, but on the other hand, it has to identify possible pathogens. These interactions of the host and its microbiome influence immune functions at all levels beginning at the initial innate defense response to acquired responses [81]. This phenomenon could be demonstrated in a study focusing on the upper airway mucosal lining fluid of the nasal cavity of human neonates. The presence of *Moraxella catarrhalis* as a

potential airway pathogen was associated with an upregulated T helper cell (Th) type 1/Th2/Th17-type inflammatory response of the airway mucosa [82]. Another human study showed a stimulation of dendritic cells by *Moraxella*, leading to a three-to-five-fold increase in interleukin (IL)-23, IL-10, and IL-12p70 in comparison to stimulation by known respiratory commensal bacteria [83]. As the microbiome influences the host immune response, one can speculate that a dysbiosis can cause disease, as has been shown for intestinal disease in dogs [84] or rhinosinusitis in a murine model [10]. It is also possible that a nasal disease process causes changes in the microbiome via different mechanisms, e.g., induction of mucosal inflammation toward a Th2-type response, interruption of immune defense [16], modification of epithelial barriers [85], mechanical obstruction and altered sinus functioning [86], including lower oxygen circulation in the upper airways caused by mucus [87], and swelling or blood vessel anomalies [88], as well as through the effects of medications [89]. Being able to describe the nasal microbiome in healthy animals and to identify possible changes that occur in the microbiome in disease could represent a first step in investigations of the role of the microbiome in the pathogenesis of diseases. As such, it could be a new way to investigate new diagnostic and therapeutic modalities.

The nasal microbial composition of cats with nasal neoplasia did not seem to be influenced by pretreatment with antibiotics according to the alpha and beta diversity. The only findings were differences in the abundance of taxa between both groups by LefSe analysis in patients who did not receive antibiotics, who presented a higher abundance of several taxa. These findings do not reflect the results of human studies indicating significant microbial changes caused by antibiotic usage [46-48]. However, the heterogeneous pretreatment and different types of nasal neoplasia within the population of cats with nasal tumors make it difficult to define a core microbiome of cats with nasal neoplasia in the present study, therefore potentially explaining the lack of antibiotic influence.

There are several limitations of this study. As mentioned previously, the groups were not age-matched, and therefore statistical comparisons of the nasal microbial composition between different disease and age groups were not useful. Another limiting factor of the study was the small number of cats included. Since the number of cats enrolled in each group was small, and significant variability was observed between individuals, a larger cohort of healthy and diseased cats should be

evaluated to define the feline nasal microbiome and its role in health and disease.

## **Conclusions**

In conclusion, the present study revealed a large number of currently uncultivable bacteria, demonstrating that the nose of cats is inhabited by richer and more diverse microbial communities than has been previously described using culture-based methods. Furthermore, age and environmental factors seemed to influence the nasal microbial composition. Researchers are only just beginning to understand the complex interactions between the host and bacterial microbiota and the impact of disrupting this fragile homeostasis in disease states. The results of the present study represent a first step in the description of the nasal microbiome in healthy and diseased cats and the identification of intrinsic and extrinsic factors that influence the microbial composition. Future research in this field might help to develop new diagnostic tools to easily identify nasal microbial changes, relate them to certain disease processes, and help clinicians in the decision process of antibiotic selection for individual patients.

## Supporting information

S1 Table. Alpha diversity. Alpha diversity measures at 25,640 sequences in healthy cats depending on age group and indoor/outdoor status and in diseased cats.

S2 Table. Relative percentages of bacterial groups. Relative percentages of bacterial groups in healthy and diseased cats at the various phylogenetic levels (phylum, class, order, family, genus) based on sequencing of the 16S rRNA gene.

## Acknowledgments

The authors thank Dr. Sophie Rothhammer and Dr. Elisabeth Kunz for technical support.

## Author Contributions

Conceptualization: ESD BSS JSS.

Data curation: ESD BT JSS TN PR.

Formal analysis: ESD BT JSS TN PR.

Funding acquisition: ESD JSS KH.

Investigation: ESD BT KW JSS.

Methodology: ESD BSS JSS.

Project administration: BSS JSS.

Resources: ESD BT JSS KH.

Software: JSS TN PR.

Supervision: BSS JSS.

Visualization: ESD JSS.

Writing ± original draft: ESD.

Writing ± review & editing: BT BSS JSS KW KH.



## References

1. Li K, Bihan M, Yooseph S, Methe BA. Analyses of the microbial diversity across the human microbiome. *PLoS One*. 2012;7(6):e32118. doi: 10.1371/journal.pone.0032118. PubMed PMID: 22719823; PubMed Central PMCID: PMC3374608.
2. Hasegawa K, Camargo CA, Jr. Airway microbiota and acute respiratory infection in children. *Expert Rev Clin Immunol*. 2015;11(7):789-92. doi: 10.1586/1744666x.2015.1045417. PubMed PMID: 25961472.
3. Mika M, Mack I, Korten I, Qi W, Aebi S, Frey U, et al. Dynamics of the nasal microbiota in infancy: A prospective cohort study. *J Allergy Clin Immunol*. 2015;135(4):905-12 e11. doi: 10.1016/j.jaci.2014.12.1909. PubMed PMID: 25636948.
4. Kil DY, Swanson KS. Companion animals symposium: role of microbes in canine and feline health. *J Anim Sci*. 2011;89(5):1498-505. doi: 10.2527/jas.2010-3498. PubMed PMID: 21036940.
5. Dethlefsen L, McFall-Ngai M, Relman DA. An ecological and evolutionary perspective on human-microbe mutualism and disease. *Nature*. 2007;449(7164):811-8. doi: 10.1038/nature06245. PubMed PMID: 17943117.
6. Grice EA, Segre JA. The human microbiome: our second genome. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2012;13:151-70. doi: 10.1146/annurev-genom-090711-163814. PubMed PMID: 22703178; PubMed Central PMCID: PMC3518434.
7. Cash HL, Whitham CV, Behrendt CL, Hooper LV. Symbiotic bacteria direct expression of an intestinal bactericidal lectin. *Science*. 2006;313(5790):1126-30. doi: 10.1126/science.1127119. PubMed PMID: 16931762; PubMed Central PMCID: PMC3518434.
8. Wanke I, Steffen H, Christ C, Krismer B, Gotz F, Peschel A, et al. Skin commensals amplify the innate immune response to pathogens by activation of distinct signaling pathways. *J Invest Dermatol*. 2011;131(2):382-90. doi: 10.1038/jid.2010.328. PubMed PMID: 21048787.

9. Charlson ES, Bittinger K, Haas AR, Fitzgerald AS, Frank I, Yadav A, et al. Topographical continuity of bacterial populations in the healthy human respiratory tract. *Am J Respir Crit Care Med*. 2011;184(8):957-63. doi: 10.1164/rccm.201104-0655OC. PubMed PMID: 21680950; PubMed Central PMCID: PMC3208663.
10. Abreu NA, Nagalingam NA, Song Y, Roediger FC, Pletcher SD, Goldberg AN, et al. Sinus microbiome diversity depletion and *Corynebacterium tuberculo*stearicum enrichment mediates rhinosinusitis. *Sci Transl Med*. 2012;4(151):151ra24. doi: 10.1126/scitranslmed.3003783. PubMed PMID: 22972842.
11. Allen EK, Koeppl AF, Hendley JO, Turner SD, Winther B, Sale MM. Characterization of the nasopharyngeal microbiota in health and during rhinovirus challenge. *Microbiome*. 2014;2:22. doi: 10.1186/2049-2618-2-22. PubMed PMID: 25028608; PubMed Central PMCID: PMC4098959.
12. Autio TJ, Tapiainen T, Koskenkorva T, Narkio M, Lappalainen M, Nikkari S, et al. The role of microbes in the pathogenesis of acute rhinosinusitis in young adults. *Laryngoscope*. 2015;125(1):E1-7. doi: 10.1002/lary.24862. PubMed PMID: 25093843.
13. Bassiouni A, Cleland EJ, Psaltis AJ, Vreugde S, Wormald PJ. Sinonasal microbiome sampling: a comparison of techniques. *PLoS One*. 2015;10(4):e0123216. doi: 10.1371/journal.pone.0123216. PubMed PMID: 25876035; PubMed Central PMCID: PMC4396979.
14. Biswas K, Hoggard M, Jain R, Taylor MW, Douglas RG. The nasal microbiota in health and disease: variation within and between subjects. *Front Microbiol*. 2015;9:134. doi: 10.3389/fmicb.2015.00134. PubMed PMID: 25784909; PubMed Central PMCID: PMC4345913.
15. Boutin S, Graeber SY, Weitnauer M, Panitz J, Stahl M, Clausnitzer D, et al. Comparison of microbiomes from different niches of upper and lower airways in children and adolescents with cystic fibrosis. *PLoS One*. 2015;10(1):e0116029. doi: 10.1371/journal.pone.0116029. PubMed PMID: 25629612; PubMed Central PMCID: PMC4309611.

16. Choi CH, Poroyko V, Watanabe S, Jiang D, Lane J, deTineo M, et al. Seasonal allergic rhinitis affects sinonasal microbiota. *Am J Rhinol Allergy*. 2014;28(4):281-6. doi: 10.2500/ajra.2014.28.4050. PubMed PMID: 25197913; PubMed Central PMCID: PMC4101129.
17. Feazel LM, Frank DN, Ramakrishnan VR. Update on bacterial detection methods in chronic rhinosinusitis: implications for clinicians and research scientists. *Int Forum Allergy Rhinol*. 2011;1(6):451-9. doi: 10.1002/alr.20071. PubMed PMID: 22144054.
18. Hilty M, Qi W, Brugger SD, Frei L, Agyeman P, Frey PM, et al. Nasopharyngeal microbiota in infants with acute otitis media. *J Infect Dis*. 2012;205(7):1048-55. doi: 10.1093/infdis/jis024. PubMed PMID: 22351941.
19. Johnson RC, Ellis MW, Lanier JB, Schlett CD, Cui T, Merrell DS. Correlation between nasal microbiome composition and remote purulent skin and soft tissue infections. *Infect Immun*. 2015;83(2):802-11. doi: 10.1128/iai.02664-14. PubMed PMID: 25486991; PubMed Central PMCID: PMC4294227.
20. Kloepper KM, Lee WM, Pappas TE, Kang TJ, Vrtis RF, Evans MD, et al. Detection of pathogenic bacteria during rhinovirus infection is associated with increased respiratory symptoms and asthma exacerbations. *J Allergy Clin Immunol*. 2014;133(5):1301-7, 7.e1-3. doi: 10.1016/j.jaci.2014.02.030. PubMed PMID: 24698319; PubMed Central PMCID: PMC4047978.
21. Laufer AS, Metlay JP, Gent JF, Fennie KP, Kong Y, Pettigrew MM. Microbial communities of the upper respiratory tract and otitis media in children. *MBio*. 2011;2(1):e00245-10. doi: 10.1128/mBio.00245-10. PubMed PMID: 21285435; PubMed Central PMCID: PMC3031303.
22. Park H, Shin JW, Park SG, Kim W. Microbial communities in the upper respiratory tract of patients with asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *PLoS One*. 2014;9(10):e109710. doi: 10.1371/journal.pone.0109710. PubMed PMID: 25329665; PubMed Central PMCID: PMC4199592.
23. Pettigrew MM, Laufer AS, Gent JF, Kong Y, Fennie KP, Metlay JP. Upper respiratory tract microbial communities, acute otitis media pathogens, and antibiotic use in healthy and sick children. *Appl Environ Microbiol*.

2012;78(17):6262-70. doi: 10.1128/aem.01051-12. PubMed PMID: 22752171; PubMed Central PMCID: PMC3416608.

24. Redinbo MR. The microbiota, chemical symbiosis, and human disease. *J Mol Biol.* 2014;426(23):3877-91. doi: 10.1016/j.jmb.2014.09.011. PubMed PMID: 25305474; PubMed Central PMCID: PMC34252811.

25. Sakwinska O, Bastic Schmid V, Berger B, Bruttin A, Keitel K, Lepage M, et al. Nasopharyngeal microbiota in healthy children and pneumonia patients. *J Clin Microbiol.* 2014;52(5):1590-4. doi: 10.1128/jcm.03280-13. PubMed PMID: 24599973; PubMed Central PMCID: PMC3993659.

26. Sellart-Altisent M, Torres-Rodriguez JM, Gomez de Ana S, Alvarado-Ramirez E. [Nasal fungal microbiota in allergic and healthy subjects]. *Rev Iberoam Micol.* 2007;24(2):125-30. PubMed PMID: 17604431.

27. Wilson MT, Hamilos DL. The nasal and sinus microbiome in health and disease. *Curr Allergy Asthma Rep.* 2014;14(12):485. doi: 10.1007/s11882-014-0485-x. PubMed PMID: 25342392.

28. Yi H, Yong D, Lee K, Cho YJ, Chun J. Profiling bacterial community in upper respiratory tracts. *BMC Infect Dis.* 2014;14:583. doi: 10.1186/s12879-014-0583-3. PubMed PMID: 25391813; PubMed Central PMCID: PMC34236460.

29. Biesbroek G, Tsivtsivadze E, Sanders EA, Montijn R, Veenhoven RH, Keijser BJ, et al. Early respiratory microbiota composition determines bacterial succession patterns and respiratory health in children. *Am J Respir Crit Care Med.* 2014;190(11):1283-92. doi: 10.1164/rccm.201407-1240OC. PubMed PMID: 25329446.

30. Bogaert D, Keijser B, Huse S, Rossen J, Veenhoven R, van Gils E, et al. Variability and diversity of nasopharyngeal microbiota in children: a metagenomic analysis. *PLoS One.* 2011;6(2):e17035. doi: 10.1371/journal.pone.0017035. PubMed PMID: 21386965; PubMed Central PMCID: PMC3046172.

31. Mizgerd JP. The infant nose. Introducing the respiratory tract to the world. *Am J Respir Crit Care Med.* 2014;190(11):1206-7. doi: 10.1164/rccm.201410-1919ED. PubMed PMID: 25436779; PubMed Central PMCID:

PMCPMC4315821.

32. Biesbroek G, Bosch AA, Wang X, Keijser BJ, Veenhoven RH, Sanders EA, et al. The impact of breastfeeding on nasopharyngeal microbial communities in infants. *Am J Respir Crit Care Med*. 2014;190(3):298-308. doi: 10.1164/rccm.201401-0073OC. PubMed PMID: 24921688.

33. Biesbroek G, Wang X, Keijser BJ, Eijkemans RM, Trzcinski K, Rots NY, et al. Seven-valent pneumococcal conjugate vaccine and nasopharyngeal microbiota in healthy children. *Emerg Infect Dis*. 2014;20(2):201-10. doi: 10.3201/eid2002.131220. PubMed PMID: 24447437; PubMed Central PMCID: PMCPMC3901477.

34. Peterson SW, Knox NC, Golding GR, Tyler SD, Tyler AD, Mabon P, et al. A Study of the Infant Nasal Microbiome Development over the First Year of Life and in Relation to Their Primary Adult Caregivers Using cpn60 Universal Target (UT) as a Phylogenetic Marker. *PLoS One*. 2016;11(3):e0152493. doi: 10.1371/journal.pone.0152493. PubMed PMID: 27019455; PubMed Central PMCID: PMCPMC4809513.

35. Whelan FJ, Verschoor CP, Stearns JC, Rossi L, Luinstra K, Loeb M, et al. The loss of topography in the microbial communities of the upper respiratory tract in the elderly. *Ann Am Thorac Soc*. 2014;11(4):513-21. doi: 10.1513/AnnalsATS.201310-351OC. PubMed PMID: 24601676.

36. Schulz BS, Richter P, Weber K, Mueller RS, Wess G, Zenker I, et al. Detection of feline *Mycoplasma* species in cats with feline asthma and chronic bronchitis. *J Feline Med Surg*. 2014;16(12):943-9. doi: 10.1177/1098612x14524969. PubMed PMID: 24574148.

37. Ursell LK, Metcalf JL, Parfrey LW, Knight R. Defining the human microbiome. *Nutr Rev*. 2012;70 Suppl 1:S38-44. doi: 10.1111/j.1753-4887.2012.00493.x. PubMed PMID: 22861806; PubMed Central PMCID: PMCPmc3426293.

38. Turnbaugh PJ, Ley RE, Hamady M, Fraser-Liggett CM, Knight R, Gordon JI. The human microbiome project. *Nature*. 2007;449(7164):804-10. doi: 10.1038/nature06244. PubMed PMID: 17943116; PubMed Central PMCID:

PMCPmc3709439.

39. Peterson J, Garges S, Giovanni M, McInnes P, Wang L, Schloss JA, et al. The NIH Human Microbiome Project. *Genome Res.* 2009;19(12):2317-23. doi: 10.1101/gr.096651.109. PubMed PMID: 19819907; PubMed Central PMCID: PMCPmc2792171.
40. Handl S, Dowd SE, Garcia-Mazcorro JF, Steiner JM, Suchodolski JS. Massive parallel 16S rRNA gene pyrosequencing reveals highly diverse fecal bacterial and fungal communities in healthy dogs and cats. *FEMS Microbiol Ecol.* 2011;76(2):301-10. doi: 10.1111/j.1574-6941.2011.01058.x. PubMed PMID: 21261668.
41. Ericsson AC, Personett AR, Grobman ME, Rindt H, Reinero CR. Composition and Predicted Metabolic Capacity of Upper and Lower Airway Microbiota of Healthy Dogs in Relation to the Fecal Microbiota. *PLoS One.* 2016;11(5):e0154646. doi: 10.1371/journal.pone.0154646. PubMed PMID: 27136381; PubMed Central PMCID: PMC4852910.
42. Vientos-Plotts AI, Ericsson AC, Rindt H, Grobman ME, Graham A, Bishop K, et al. Dynamic changes of the respiratory microbiota and its relationship to fecal and blood microbiota in healthy young cats. *PLoS One.* 2017;12(3):e0173818. doi: 10.1371/journal.pone.0173818. PubMed PMID: 28278278.
43. Slifierz MJ, Friendship RM, Weese JS. Longitudinal study of the early-life fecal and nasal microbiotas of the domestic pig. *BMC Microbiol.* 2015;15(1):184. doi: 10.1186/s12866-015-0512-7. PubMed PMID: 26391877; PubMed Central PMCID: PMC4578254.
44. NIH Human Microbiome Project. Core Microbiome Sampling Protocol A (HMP-A) 2011 [10.03.2017]. Available from: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gap/cgi-bin/study.cgi?study\\_id=phs000228.v3.p1](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gap/cgi-bin/study.cgi?study_id=phs000228.v3.p1).
45. Deusch O, O'Flynn C, Colyer A, Swanson KS, Allaway D, Morris P. A Longitudinal Study of the Feline Faecal Microbiome Identifies Changes into Early Adulthood Irrespective of Sexual Development. *PLoS One.* 2015;10(12):e0144881. doi: 10.1371/journal.pone.0144881. PubMed PMID: 26659594; PubMed Central

PMCID: PMCPMC4682054.

46. Rutten NB, Rijkers GT, Meijssen CB, Crijns CE, Oudshoorn JH, van der Ent CK, et al. Intestinal microbiota composition after antibiotic treatment in early life: the INCA study. *BMC Pediatr.* 2015;15:204. doi: 10.1186/s12887-015-0519-0. PubMed PMID: 26645894; PubMed Central PMCID: PMCPMC4673740.

47. Panda S, El khader I, Casellas F, López Vivancos J, García Cors M, Santiago A, et al. Short-Term Effect of Antibiotics on Human Gut Microbiota. *PLoS One.* 2014;9(4):e95476. doi: 10.1371/journal.pone.0095476. PubMed PMID: PMC3991704.

48. Hauser LJ, Ir D, Kingdom TT, Robertson CE, Frank DN, Ramakrishnan VR. Investigation of bacterial repopulation after sinus surgery and perioperative antibiotics. *Int Forum Allergy Rhinol.* 2016;6(1):34-40. doi: 10.1002/alr.21630. PubMed PMID: 26388320.

49. Vingataramin L, Frost EH. A single protocol for extraction of gDNA from bacteria and yeast. *Biotechniques.* 2015;58(3):120-5. doi: 10.2144/000114263. PubMed PMID: 25757544.

50. Garcia-Mazcorro JF, Suchodolski JS, Jones KR, Clark-Price SC, Dowd SE, Minamoto Y, et al. Effect of the proton pump inhibitor omeprazole on the gastrointestinal bacterial microbiota of healthy dogs. *FEMS Microbiol Ecol.* 2012;80(3):624-36. doi: 10.1111/j.1574-6941.2012.01331.x. PubMed PMID: 22324305.

51. Dowd SE, Sun Y, Wolcott RD, Domingo A, Carroll JA. Bacterial tag-encoded FLX amplicon pyrosequencing (bTEFAP) for microbiome studies: bacterial diversity in the ileum of newly weaned Salmonella-infected pigs. *Foodborne Pathog Dis.* 2008;5(4):459-72. doi: 10.1089/fpd.2008.0107. PubMed PMID: 18713063.

52. Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK, et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat Methods.* 2010;7(5):335-6. doi: 10.1038/nmeth.f.303. PubMed PMID: 20383131; PubMed Central PMCID: PMCPmc3156573.

53. Edgar RC. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics* (Oxford, England). 2010;26(19):2460-1. doi: 10.1093/bioinformatics/btq461. PubMed PMID: 20709691.
54. DeSantis TZ, Hugenholtz P, Larsen N, Rojas M, Brodie EL, Keller K, et al. Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. *Appl Environ Microbiol*. 2006;72(7):5069-72. doi: 10.1128/aem.03006-05. PubMed PMID: 16820507; PubMed Central PMCID: PMC1489311.
55. Hariharan H, Matthew V, Fountain J, Snell A, Doherty D, King B, et al. Aerobic bacteria from mucous membranes, ear canals, and skin wounds of feral cats in Grenada, and the antimicrobial drug susceptibility of major isolates. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 2011;34(2):129-34. doi: 10.1016/j.cimid.2010.05.001. PubMed PMID: 20627391.
56. Johnson LR, Kass PH. Effect of sample collection methodology on nasal culture results in cats. *J Feline Med Surg*. 2009;11(8):645-9. doi: 10.1016/j.jfms.2008.12.004. PubMed PMID: 19201636.
57. Schulz BS, Wolf G, Hartmann K. Bacteriological and antibiotic sensitivity test results in 271 cats with respiratory tract infections. *Vet Rec*. 2006;158(8):269-70. PubMed PMID: 16501159.
58. Veir JK, Ruch-Gallie R, Spindel ME, Lappin MR. Prevalence of selected infectious organisms and comparison of two anatomic sampling sites in shelter cats with upper respiratory tract disease. *J Feline Med Surg*. 2008;10(6):551-7. doi: 10.1016/j.jfms.2008.04.002. PubMed PMID: 18539065.
59. Schulz C, Hartmann K, Mueller RS, Helps C, Schulz BS. Sampling sites for detection of feline herpesvirus-1, feline calicivirus and *Chlamydia felis* in cats with feline upper respiratory tract disease. *J Feline Med Surg*. 2015. doi: 10.1177/1098612x15569615. PubMed PMID: 25660223.
60. Bisgaard H, Hermansen MN, Buchvald F, Loland L, Halkjaer LB, Bonnelykke K, et al. Childhood asthma after bacterial colonization of the airway in neonates. *N Engl J Med*. 2007;357(15):1487-95. doi: 10.1056/NEJMoa052632. PubMed PMID: 17928596.



61. Vissing NH, Chawes BL, Bisgaard H. Increased risk of pneumonia and bronchiolitis after bacterial colonization of the airways as neonates. *Am J Respir Crit Care Med*. 2013;188(10):1246-52. doi: 10.1164/rccm.201302-0215OC. PubMed PMID: 24090102.
62. Teo SM, Mok D, Pham K, Kusel M, Serralha M, Troy N, et al. The infant nasopharyngeal microbiome impacts severity of lower respiratory infection and risk of asthma development. *Cell Host Microbe*. 2015;17(5):704-15. doi: 10.1016/j.chom.2015.03.008. PubMed PMID: 25865368; PubMed Central PMCID: PMC4433433.
63. Pugh GW, Jr., McDonald TJ. Identification of bovine carriers of *Moraxella bovis* by comparative cultural examinations of ocular and nasal secretions. *Am J Vet Res*. 1986;47(11):2343-5. PubMed PMID: 3789493.
64. Dickey AM, Loy JD, Bono JL, Smith TP, Apley MD, Lubbers BV, et al. Large genomic differences between *Moraxella bovoculi* isolates acquired from the eyes of cattle with infectious bovine keratoconjunctivitis versus the deep nasopharynx of asymptomatic cattle. *Vet Res*. 2016;47(1):31. doi: 10.1186/s13567-016-0316-2. PubMed PMID: 26872821; PubMed Central PMCID: PMC4752781.
65. Sturgeon A, Pinder SL, Costa MC, Weese JS. Characterization of the oral microbiota of healthy cats using next-generation sequencing. *Vet J*. 2014;201(2):223-9. doi: 10.1016/j.tvjl.2014.01.024. PubMed PMID: 24680670.
66. Harris S, Croft J, O'Flynn C, Deusch O, Colyer A, Allsopp J, et al. A Pyrosequencing Investigation of Differences in the Feline Subgingival Microbiota in Health, Gingivitis and Mild Periodontitis. *PLoS One*. 2015;10(11):e0136986. doi: 10.1371/journal.pone.0136986. PubMed PMID: 26605793; PubMed Central PMCID: PMC4659563.
67. Bhatt AS, Freeman SS, Herrera AF, Pedomallu CS, Gevers D, Duke F, et al. Sequence-based discovery of *Bradyrhizobium enterica* in cord colitis syndrome. *N Engl J Med*. 2013;369(6):517-28. doi: 10.1056/NEJMoa1211115. PubMed PMID: 23924002; PubMed Central PMCID: PMC3889161.
68. Gorkiewicz G, Trajanoski S, Hogenauer C. *Bradyrhizobium enterica* in cord

colitis syndrome. *N Engl J Med.* 2013;369(19):1866-7. doi: 10.1056/NEJMc1311318#SA1. PubMed PMID: 24195569.

69. Lo SC, Hung GC, Li B, Lei H, Li T, Nagamine K, et al. Mixed group of Rhizobiales microbes in lung and blood of a patient with fatal pulmonary illness. *Int J Clin Exp Pathol.* 2015;8(11):13834-52. PubMed PMID: 26823697; PubMed Central PMCID: PMC4713483.

70. Lo SC, Hung GC, Li B, Lei H, Li T, Nagamine K, et al. Isolation of novel *Afipia septicemium* and identification of previously unknown bacteria *Bradyrhizobium* sp. OHSU\_III from blood of patients with poorly defined illnesses. *PLoS One.* 2013;8(10):e76142. doi: 10.1371/journal.pone.0076142. PubMed PMID: 24155888; PubMed Central PMCID: PMC3796525.

71. McDonald R, Zhang F, Watts JE, Schreier HJ. Nitrogenase diversity and activity in the gastrointestinal tract of the wood-eating catfish *Panaque nigrolineatus*. *ISME J.* 2015;9(12):2712-24. doi: 10.1038/ismej.2015.65. PubMed PMID: 25909976; PubMed Central PMCID: PMC4817639.

72. Wu S, Tian J, Wang G, Li W, Zou H. Characterization of bacterial community in the stomach of yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*). *World J Microbiol Biotechnol.* 2012;28(5):2165-74. doi: 10.1007/s11274-012-1022-5. PubMed PMID: 22806039.

73. Pinto-Tomas AA, Sittenfeld A, Uribe-Lorio L, Chavarria F, Mora M, Janzen DH, et al. Comparison of midgut bacterial diversity in tropical caterpillars (Lepidoptera: Saturniidae) fed on different diets. *Environ Entomol.* 2011;40(5):1111-22. doi: 10.1603/en11083. PubMed PMID: 22251723.

74. Kizilova AK, Kravchenko IK. Diversity of diazotrophic gut inhabitants of pikas (Ochotonidae) revealed by PCR-DGGE analysis. *Mikrobiologiya.* 2014;83(3):366-74. PubMed PMID: 25842897.

75. Dolieslager SM, Riggio MP, Lennon A, Lappin DF, Johnston N, Taylor D, et al. Identification of bacteria associated with feline chronic gingivostomatitis using culture-dependent and culture-independent methods. *Vet Microbiol.* 2011;148(1):93-8. doi: 10.1016/j.vetmic.2010.08.002. PubMed PMID: 20828946.

76. Goldstein EJ, Citron DM, Merriam CV, Tyrrell KL. Ceftriaxone versus isolates from animal bite wounds: comparative in vitro activities against 243 isolates, including 156 *Pasteurella* species isolates. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012;56(12):6319-23. doi: 10.1128/aac.01794-12. PubMed PMID: 23027193; PubMed Central PMCID: PMC3497206.
77. Berger A, Willi B, Meli ML, Boretti FS, Hartnack S, Dreyfus A, et al. Feline calicivirus and other respiratory pathogens in cats with Feline calicivirus-related symptoms and in clinically healthy cats in Switzerland. *BMC Vet Res*. 2015;11:282. doi: 10.1186/s12917-015-0595-2. PubMed PMID: 26566897; PubMed Central PMCID: PMC4644299.
78. Gourkow N, Lawson JH, Hamon SC, Phillips CJ. Descriptive epidemiology of upper respiratory disease and associated risk factors in cats in an animal shelter in coastal western Canada. *Can Vet J*. 2013;54(2):132-8. PubMed PMID: 23904635; PubMed Central PMCID: PMC3552587.
79. Holst BS, Hanas S, Berndtsson LT, Hansson I, Soderlund R, Aspan A, et al. Infectious causes for feline upper respiratory tract disease--a case-control study. *J Feline Med Surg*. 2010;12(10):783-9. doi: 10.1016/j.jfms.2010.06.002. PubMed PMID: 20851008.
80. McManus CM, Levy JK, Andersen LA, McGorray SP, Leutenegger CM, Gray LK, et al. Prevalence of upper respiratory pathogens in four management models for unowned cats in the Southeast United States. *Vet J*. 2014;201(2):196-201. doi: 10.1016/j.tvjl.2014.05.015. PubMed PMID: 24923756.
81. Kamada N, Nunez G. Regulation of the immune system by the resident intestinal bacteria. *Gastroenterology*. 2014;146(6):1477-88. doi: 10.1053/j.gastro.2014.01.060. PubMed PMID: 24503128; PubMed Central PMCID: PMC3995843.
82. Folsgaard NV, Schjorring S, Chawes BL, Rasmussen MA, Krogfelt KA, Brix S, et al. Pathogenic bacteria colonizing the airways in asymptomatic neonates stimulates topical inflammatory mediator release. *Am J Respir Crit Care Med*. 2013;187(6):589-95. doi: 10.1164/rccm.201207-1297OC. PubMed PMID: 23370914.

83. Larsen JM, Steen-Jensen DB, Laursen JM, Sondergaard JN, Musavian HS, Butt TM, et al. Divergent pro-inflammatory profile of human dendritic cells in response to commensal and pathogenic bacteria associated with the airway microbiota. *PLoS One*. 2012;7(2):e31976. doi: 10.1371/journal.pone.0031976. PubMed PMID: 22363778; PubMed Central PMCID: PMC3283686.
84. Vazquez-Baeza Y, Hyde ER, Suchodolski JS, Knight R. Dog and human inflammatory bowel disease rely on overlapping yet distinct dysbiosis networks. *Nat Microbiol*. 2016;1:16177. doi: 10.1038/nmicrobiol.2016.177. PubMed PMID: 27694806.
85. Kim RJ, Biswas K, Hoggard M, Taylor MW, Douglas RG. Paired analysis of the microbiota of surface mucus and whole-tissue specimens in patients with chronic rhinosinusitis. *Int Forum Allergy Rhinol*. 2015;5(10):877-83. doi: 10.1002/alr.21600. PubMed PMID: 26215930.
86. Alho OP, Karttunen TJ, Karttunen R, Tuokko H, Koskela M, Suramo I, et al. Subjects with allergic rhinitis show signs of more severely impaired paranasal sinus functioning during viral colds than nonallergic subjects. *Allergy*. 2003;58(8):767-71. PubMed PMID: 12859556.
87. Zariwala MA, Knowles MR, Leigh MW. Primary Ciliary Dyskinesia. In: Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH, Wallace SE, Amemiya A, Bean LJH, et al., editors. *GeneReviews(R)*. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 2007.
88. Liu CM, Shun CT, Song HC, Lee SY, Hsu MM, How SW. Investigation into allergic response in patients with chronic sinusitis. *J Formos Med Assoc*. 1992;91(3):252-7. PubMed PMID: 1354684.
89. Ungaro R, Bernstein CN, Gearry R, Hviid A, Kolho KL, Kronman MP, et al. Antibiotics associated with increased risk of new-onset Crohn's disease but not ulcerative colitis: a meta-analysis. *Am J Gastroenterol*. 2014;109(11):1728-38. doi: 10.1038/ajg.2014.246. PubMed PMID: 25223575.

## IV. DISKUSSION

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde das nasale Mikrobiom bei gesunden Katzen und Katzen mit Erkrankungen der Nase in Form von Katzenschnupfen oder maligner nasaler Neoplasie untersucht. Zudem wurde der Einfluss von individuellen Faktoren und der Umgebung auf das nasale Mikrobiom von gesunden Katzen evaluiert. Der Schwerpunkt der Untersuchungen lag dabei auf dem Bakterienvorkommen - die Existenz von anderen Mikroben wie Viren oder Pilzen wurde nicht berücksichtigt. Dies ist die erste Studie, die auf der Genomsequenzierung des bakteriellen Mikrobioms der Nasenhöhle von Katzen basiert.

Die in dieser Studie verwendete Genomsequenzierung weist gegenüber herkömmlichen Nachweismethoden von Bakterien große Vorteile auf. So konnten im Rahmen der vorliegenden Arbeit 24 Bakterienstämme und insgesamt 375 OTUs nachgewiesen werden. Viele dieser Bakterien wurden bisher weder in der Nase von Katzen nachgewiesen noch mit der bakteriellen Kolonisation von Katzennasen in Zusammenhang gebracht. Nichts desto trotz kann auch die Genomsequenzierung dem Anspruch auf Vollständigkeit des Nachweises aller Bakterien nicht gerecht werden (ASHELFORD et al., 2005; DESAI et al., 2012).

Die Ergebnisse dieser Studie liefern einen ersten Hinweis, dass die bakterielle Besiedlung der felines Nasenhöhle sowohl vom Alter als auch von Umweltfaktoren beeinflusst wird. In humanmedizinischen Studien wurde beschrieben, dass das Mikrobiom einen hohen Grad an Individualität aufweist und dynamische Veränderungen während des ersten Lebensjahres erfährt. Dies äußert sich in einer gesteigerten bakteriellen Dichte bei einer geringeren Diversität im Kindesalter (MIKA et al., 2015). Parallel dazu wurden auch in der vorliegenden Studie Unterschiede in der Zusammensetzung des nasalen Mikrobioms von Katzen in Abhängigkeit von ihrem Alter festgestellt. Dieser Umstand lässt es nicht sinnvoll erscheinen, gesunde und kranke Katzen verschiedenen Alters miteinander zu vergleichen. Ein detektierter Unterschied des nasalen Mikrobioms könnte in diesem Fall nicht nur abhängig von einer Grundkrankheit, sondern auch durch das Alter beeinflusst sein. Ein Problem der vorliegenden Studie war, dass FURTD vorwiegend bei sehr jungen Katzen, die jünger als ein Jahr sind, vorgefunden wird

(BANNASCH & FOLEY, 2005; DI MARTINO et al., 2007). Katzen mit maligner nasaler Neoplasie sind hingegen meist höheren Alters (ENDERSON et al., 2004; GALLER et al., 2012). Da gesunde Katzen in der vorliegenden Studie ohne jegliche Anzeichen einer Krankheit sein sollten, konnten nicht viele alte Katzen in die Studie aufgenommen werden. Ein ähnliches Problem zeigte sich bei der Rekrutierung junger Katzen, die oft milde Symptome eines Katzenschnupfens zeigten und so weder in die gesunde Kontrollgruppe noch in die Gruppe der akut an Katzenschnupfen erkrankten Studienteilnehmer aufgenommen werden konnten. Demzufolge bestand in der vorliegenden Studie für das Alter im Vergleich von gesunden Katzen, Katzen mit nasaler Neoplasie und Katzen mit FURTD ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen ( $p < 0.001$ ).

Die Ergebnisse dieser Arbeit geben Hinweise darauf, dass einige Bakterien zum Mikrobiom gesunder Katzen zu zählen sind, während andere in ihrer Häufigkeit durch den Krankheitsstatus beeinflusst werden. Es bleibt aber weiterhin unklar, ob das Mikrobiom erkrankter Tiere durch die Krankheit und die damit einhergehende systemische Immunsuppression verändert wird, oder ob eine Änderung des Mikrobioms in die Pathogenese bestimmter Krankheitsprozesse involviert ist. Es bestehen unterschiedliche Arten der Interaktion zwischen Immunsystem und Mikrobiom: Einerseits muss das Immunsystem lernen, kommensale Bakterien zu tolerieren, andererseits muss es mögliche Pathogene identifizieren können. Dieses Zusammenspiel von Wirt und seinem Mikrobiom beeinflusst Immunfunktionen auf allen Ebenen, beginnend bei initial angeborenen bis hin zu erworbenen Immunantworten (KAMADA & NUNEZ, 2014). Dieser Zusammenhang konnte in einer Studie, die sich mit dem Flüssigkeitsfilm auf der Mukosa des oberen Atemtrakts Neugeborener beschäftigte, aufgezeigt werden: Wurde das im Atemtrakt potentiell pathogen wirkende Bakterium *Moraxella catarrhalis* nachgewiesen, konnte auch eine erhöhte, gemischte T-Helferzellen Entzündungsreaktion vom Typ 1, 2 und 17 der respiratorischen Schleimhaut festgestellt werden (FOLSGAARD et al., 2013). Eine weitere humanmedizinische Studie zeigte, dass eine Stimulation von dendritischen Zellen durch *Moraxella* verglichen mit einer Stimulation durch Kommensalen des Respirationstrakts zu einem drei- bis fünffachen Anstieg von Interleukinen (IL-10, IL-23, und IL-12p70) führte (LARSEN et al., 2012).

Oftmals ist unklar, welche qualitativen und quantitativen Veränderungen des

Mikrobioms bedeutend sind und ob diese Änderungen mit Krankheiten assoziiert sind. Ferner bleibt es eine Herausforderung, zwischen Ursache und Folge einer Erkrankung zu unterscheiden. Da das Mikrobiom die Immunantwort des Wirts beeinflusst, kann spekuliert werden, dass eine Dysbiose Krankheiten auslösen kann, wie beispielsweise für intestinale Erkrankungen des Hundes (VAZQUEZ-BAEZA et al., 2016), gastrointestinale Tumorerkrankungen des Menschen (SHEFLIN et al., 2014) oder Rhinosinusitis im Mausmodell (ABREU et al., 2012) berichtet. Darüber hinaus ist es auch möglich, dass nasale Erkrankungen Veränderungen des Mikrobioms durch unterschiedliche Mechanismen verursachen. Anzuführen sind eine T2-Helferzellen induzierte Entzündung der Mukosa und Störung der Immunabwehr (CHOI et al., 2014a) sowie Modifikationen der epithelialen Barrieren (KIM et al., 2015). Ebenfalls denkbar sind mechanische Obstruktionen und veränderte Sinusfunktionen (ALHO et al., 2003) und damit einhergehende geringere Sauerstoffzirkulation in den oberen Atemwegen durch Schleim (ZARIWALA et al., 2007), Schwellungen oder Blutgefäßanomalien (LIU et al., 1992), aber auch hervorgerufen durch Medikamente (UNGARO et al., 2014). Die Definition des nasalen Mikrobioms bei gesunden Tieren und die mit Erkrankung einhergehenden Veränderungen des Mikrobioms stellen einen ersten Schritt in der Erforschung des Mikrobioms in Gesundheit und Krankheit dar. Als solches könnte dies ein erster Schritt sein, um neue diagnostische und therapeutische Wege zu begehen. Insbesondere Studien in der Humanmedizin stellten diesbezüglich einen positiven Einfluss von oral verabreichten Probiotika auf das nasale Mikrobiom und Erkrankungen der Nase fest (OUWEHAND et al., 2009; GUILLEMARD et al., 2010; YAQOOB, 2014). Probiotika wird zugeschrieben, bei prophylaktischer oraler Verabreichung das Risiko für respiratorische Infektionserkrankungen zu reduzieren (RIO et al., 2002; OUWEHAND et al., 2016) oder positiv auf den Schweregrad einer bestehenden Erkrankung einzuwirken (RIO et al., 2002) und somit zu einem geringeren Gebrauch von Antibiotika zu führen (OUWEHAND et al., 2016). Darüber hinaus können Probiotika enterale Nebenwirkungen antibiotischer Therapie wie beispielsweise Durchfall limitieren (OUWEHAND et al., 2016). Global gesehen das wichtigste Argument für die Erforschung des Mikrobioms und in diesem Zusammenhang alternativer Behandlungsmethoden durch Probiotika stellt die Erkenntnis dar, dass der Einsatz von Probiotika nicht zu einer Zunahme von Antibiotikaresistenzen führt und womöglich sogar eben diese reduzieren kann (OUWEHAND et al., 2016). Die Identifikation von

Veränderungen des Mikrobioms bei verschiedenen Krankheiten oder auch individuelle Veränderungen kann es ermöglichen, mit spezifischen, individuellen Probiotika zielgenau auf die krankheitsbedingten Veränderungen des Mikrobioms einzugehen (GRIMM & RIEDEL, 2016). Außerdem kann mit diesem Wissen Rücksicht auf die individuelle Verstoffwechselung von Medikamenten genommen werden (KHALSA et al., 2017).

In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass das nasale Mikrobiom von Katzen sehr viel diverser ist, als bisher angenommen. Darüber hinaus wurde belegt, dass kulturelle Methoden die Gesamtheit der die Katzennase besiedelnden Bakterien nicht darstellen können. Diesbezüglich liegen keine Vergleichsstudien vor, allerdings können Vergleiche mit Angaben aus älteren kulturbasierten Studien durchgeführt werden (SCHULZ et al., 2006; VEIR et al., 2008; JOHNSON & KASS, 2009; HARIHARAN et al., 2011). Die gewonnenen Daten verdeutlichten, dass eine hohe individuelle Variabilität hinsichtlich Häufigkeit und Anzahl der nachgewiesenen Bakterien innerhalb der beprobten Katzen vorherrscht. Diese Beobachtung steht in Einklang mit Beobachtungen beim nasalen Mikrobiom des Menschen (RASMUSSEN et al., 2000; BOGAERT et al., 2011; ALLEN et al., 2014; BISWAS et al., 2015; RAMAKRISHNAN et al., 2015; KASPAR et al., 2016). Beim Menschen konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass diese hochgradige Individualität des Mikrobioms im oberen Respirationstrakt schon in sehr jungem Alter vorzufinden ist (BOGAERT et al., 2011; SAKWINSKA et al., 2014). Auch durch lokale Entzündungen (KASPAR et al., 2016), Virusinfektion (ALLEN et al., 2014) oder CRS (BISWAS et al., 2015; RAMAKRISHNAN et al., 2015) wurde die hohe Individualität des Mikrobioms nicht beeinflusst.

Ein interessantes Ergebnis der Studie deutet außerdem an, dass die Zusammensetzung des nasalen Mikrobioms gesunder Katzen abhängig von ihrer Umgebung ist. Bei der Interpretation dieser Ergebnisse muss allerdings berücksichtigt werden, dass sich auch das Alter von gesunden Hauskatzen und gesunden Freigängern signifikant unterschied und somit einen Einfluss haben könnte. Die Beta-Diversität wies bei Freigängern und Hauskatzen Unterschiede auf. Mithilfe der Unique Fraction Metrik (UniFrac) konnte gezeigt werden, dass zwischen dem nasalen Mikrobiom von Freigängern und Hauskatzen eine signifikante phylogenetische Distanz herrschte. Auch wiesen Freigänger eine niedrigere Alpha-Diversität auf als reine Hauskatzen, Tierheimkatzen und



Hauskatzen mit Balkonzugang. Diese Erkenntnis überrascht in Anbetracht der Tatsache, dass die Nase das Verbindungskompartiment zur Außenwelt darstellt und die mikrobielle Exposition eines Individuums in Räumen im Gegensatz zu der mikrobiellen Vielfalt in Außenbereichen sehr viel geringer ist (GIBBONS, 2016). Beim Menschen konnte im Rahmen einer Längsschnittstudie der Umkehrschluss gezeigt werden. Die bakterielle Zusammensetzung der häuslichen Umgebung von Menschen wird demnach durch ihr Mikrobiom beeinflusst. Die Nase wies hierbei im Gegensatz zu den anderen beprobten Körperoberflächen den höchsten interindividuellen Unterschied auf und hatte mit den beprobten Oberflächen der Umgebung am wenigsten OTUs gemeinsam (LAX et al., 2014). Ausgehend von der Hygienehypothese wird beim Menschen eine hohe mikrobielle Diversität in der Umwelt oft mit einem verringerten Risiko, an Asthma zu erkranken, assoziiert (EGE et al., 2011). Bei Kindern korrelieren Umweltfaktoren, wie das Leben auf oder der enge Kontakt mit einem Bauernhof und die damit einhergehende mikrobielle Vielfalt sowohl in Matratzenstaub als auch in ihrem Nasenmikrobiom negativ mit einer Asthmaerkrankung. Interessanterweise wurden Bakterien, deren Ursprung dem Bauernhof zugerechnet wird, häufiger in Hausstaub aus den Matratzen der Kinder als in ihren Nasen nachgewiesen. Jedoch konnte in den Matratzen von Bauernhofkindern eine höhere bakterielle Vielfalt als im Matratzenstaub anderer Kinder festgestellt werden (BIRZELE et al., 2017). Die Ergebnisse der Untersuchung der Umwelteinflüsse im Rahmen der vorliegenden Studie werden relativiert durch die Berücksichtigung der Altersabhängigkeit. Diese wurde in zahlreichen humanmedizinischen Studien als einflussreicher Faktor beschrieben. Diese Erkenntnis impliziert, dass das Alter auch bei Katzen einen entscheidenden Einfluss auf die Zusammensetzung des Mikrobioms hat. Betrachtet man die Studienteilnehmer, die im Rahmen dieser Arbeit herangezogen wurden, ist auffällig, dass die Altersverteilung hinsichtlich der Haltungsformen nicht gleich ist. So gehörte die Mehrzahl der Hauskatzen zur Altersgruppe 3 (> 1 – 5 Jahre), die im Altersvergleich ebenfalls die höchste mikrobielle Diversität aufwies. Daraus resultierend können beide Parameter in diesem Fall nicht gänzlich voneinander separiert betrachtet werden. Die vorliegenden Ergebnisse liefern folglich einen ersten Hinweis auf die Alters- und Umweltabhängigkeit, jedoch sind zum endgültigen Beweis dieser Kausalität weiterführende Untersuchungen vonnöten.

Im Rahmen der vorliegenden Studie waren *Moraxella*, *Bradyrhizobiaceae*,

*Sediminibacterium*, *Alloicoccus* und *Neisseriaceae* die häufigsten Bakterien in der Nase von gesunden Katzen. Überraschenderweise war das zweithäufigste Taxon sowohl bei gesunden Tieren als auch bei Katzen mit Katzenschnupfen *Bradyrhizobiaceae*. Vorher wurde dieses Bakterium nie als Bewohner der feline Nase beschrieben, konnte allerdings kürzlich erstmals im Oropharynx gesunder Katzen detektiert werden (VIENTOS-PLOTTS et al., 2017a). Andere häufige Taxa, die im Rahmen in der vorliegenden Studie in der Nase von gesunden Katzen nachgewiesen wurden, wie *Sediminibacterium*, *Alloicoccus* und *Neisseriaceae*, wurden bisher nicht bei Katzen beschrieben. Darüber hinaus identifizierte die vorliegende Studie im Gegensatz zu vorherigen auf Kultur basierenden Berichten eine große Vielfalt an verschiedenen Bakterien, die die feline Nase besiedeln (SCHULZ et al., 2006; VEIR et al., 2008; JOHNSON & KASS, 2009; HARIHARAN et al., 2011).

Die am häufigsten identifizierte Familie bei gesunden Katzen und Katzen mit Katzenschnupfen war *Moraxellaceae*. Beim Menschen wurde *M. catarrhalis* aus dem Hypopharynx von Neugeborenen kultiviert und als Risikofaktor für Asthma im Kindesalter (BISGAARD et al., 2007) und Bronchiolitis oder Pneumonie (VISSING et al., 2013) identifiziert. Während des ersten Lebensjahres kann *Moraxella* spp. häufiger bei Kindern mit akuten Infektionen des Respirationstrakts als bei gesunden nachgewiesen werden (TEO et al., 2015). In der Rindermedizin werden *Moraxella bovis* und *Moraxella bovoculi* mit der bovinen Keratokonjunktivitis in Zusammenhang gebracht (PUGH & MCDONALD, 1986), konnten jedoch auch schon im Nasopharynx asymptomatischer Rinder nachgewiesen werden (DICKY et al., 2016). Studien, die sich mit der Sequenzierung des oralen Mikrobioms von gesunden (STURGEON et al., 2014) und von Katzen mit und ohne Periodontitis (HARRIS et al., 2015) beschäftigten, identifizierten *Moraxella* spp. als eine der Core Spezies in der Maulhöhle gesunder Katzen. Dementsprechend repräsentiert die Familie *Moraxellaceae* auch die häufigste Bakterienfamilie in der Nasenhöhle von Katzen. In einer Studie mit 59 Katzen mit Katzenschnupfen wurde *Moraxella* spp. aus vier Nasentupfern und 21 Tupferproben des Pharynx aerob kultiviert (VEIR et al., 2008). Ergebnisse der vorliegenden auf Genomsequenzierung basierenden Studie sind allerdings hinweisend dafür, dass *Moraxella* zur physiologischen bakteriellen Population in Katzensnasen zu zählen ist.

Bakterien, die zur Familie der *Bradyrhizobiaceae* gehören, wurden in der vorliegenden Studie häufiger in der Nase von Katzen mit nasaler Neoplasie, jedoch ebenfalls in den Nasentupfern von gesunden Katzen nachgewiesen. Dieses Bakterium wurde bisher noch nie in der Nase von Katzen beschrieben. Allerdings wurde kürzlich eine Studie veröffentlicht, die das Mikrobiom in Bronchoalveolarlavage, Oropharynx, Blut und Fäzes von jungen, gesunden Katzen untersuchte und *Bradyrhizobiaceae* in diesen Körperregionen detektierte (VIENTOS-PLOTTS et al., 2017a). Vorher wurde *Bradyrhizobium enterica* in Biopsien des Kolons von Menschen mit Cord Colitis Syndrom (BHATT et al., 2013; GORKIEWICZ et al., 2013), in Blut und Lunge eines Patienten mit einer tödlich verlaufenen Lungenerkrankung (LO et al., 2015) und in Blutproben von Patienten mit Erkrankung unbekannter Genese (LO et al., 2013) nachgewiesen. Im Tierreich wurde *Bradyrhizobium* spezies (*Bradyrhizobium* sp.) im Gastrointestinaltrakt des Schwarzlinien-Harnischwels (*Panaque nigrolineatus*) (MCDONALD et al., 2015), des Amur-Stachelwels (*Pelteobagrus fulvidraco*) (WU et al., 2012), von Raupen (Lepidoptera: Saturniidae), die in den Tropen beheimatet sind (PINTO-TOMAS et al., 2011) und auch in Zäkum und Kolon von Pfeifhasen (Ochotonidae), die zu den Hasenartigen zählen, (KIZILOVA & KRAVCHENKO, 2014) nachgewiesen. Diesen Studien war gemein, dass die untersuchten Tiere Herbivore waren. Obwohl nicht näher auf den Gesundheitszustand der untersuchten Probanden eingegangen wurde, wurde *Bradyrhizobium* sp. eine wichtige Rolle bezüglich der in der Verdauungsphysiologie von Herbivoren notwendigen Stickstofffixierung zugeschrieben. Die Rolle von *Bradyrhizobiaceae* im oberen Respirationstrakt von Katzen und ihre mögliche Rolle in der Pathogenese von nasalen Neoplasien bei der Katze bleibt Gegenstand zukünftiger Studien.

Die nasale mikrobielle Komposition von Katzen mit Nasentumoren schien unter Betrachtung der Alpha- und Beta-Diversität nicht durch eine antibiotische Vorbehandlung beeinflusst worden zu sein. Als einzig signifikanter Unterschied konnte festgestellt werden, dass nicht vorbehandelte Katzen bei der differierenden Abundanz-Analyse LEfSe-Analyse (linear discriminant analysis effect size) bei einigen Taxa ein höheres Vorkommen zeigten. Diese Beobachtung spiegelt nicht die Ergebnisse von humanmedizinischen Studien wieder, die eine signifikante mikrobielle Veränderung durch den Gebrauch von Antibiotika verzeichneten (PANDA et al., 2014; RUTTEN et al., 2015; HAUSER et al., 2016). Die heterogene

Vorbehandlung und die unterschiedlichen Typen nasaler Neoplasien innerhalb der Gruppe der Tumorpatienten der vorliegenden Studie erschweren jedoch die Definition eines Core-Mikrobioms. Dies könnte auch den Grund für den scheinbar fehlenden Einfluss der Antibiotikatherapie darstellen.

Bakterielle Pathogene, die bekanntermaßen am Katzenschnupfenkomplex beteiligt sind, wie beispielsweise *C. felis* und *Mycoplasma* spp. (LITSTER et al., 2015), wurden in der vorliegenden Studie nur bei erkrankten Katzen, jedoch nicht bei gesunden Tieren nachgewiesen. Diese Beobachtung steht im Gegensatz zu einer früheren Studie, die *Mycoplasma* spp. a mittels Kultur und PCR auch aus Nasentupfern von respiratorisch gesunden Katzen isolieren konnte (SCHULZ et al., 2014). Die meisten Studien, deren Ziel der Nachweis von *C. felis* und *Mycoplasma* spp. bei gesunden Katzen war, beprobten allerdings Konjunktiven und/oder Oropharynx (HOLST et al., 2010; GOURKOW et al., 2013; MCMANUS et al., 2014; BERGER et al., 2015). Da die Anzahl der Katzen mit Katzenschnupfen in der vorliegenden Studie limitiert war, konnte nicht evaluiert werden, welche Rolle die Pathogene FHV-1, FCV und *C. felis* in der Zusammensetzung des nasalen Mikrobioms während eines akuten Katzenschnupfens spielen.

Katzen mit Katzenschnupfen wiesen am häufigsten die Bakteriengenera *Moraxella*, nicht weiter unterteilte *Bradyrhizobiaceae*, *Staphylococcus*, *Pasteurella*, *Chlamydia* und *Streptococcus* auf. In früheren Studien, die auf kulturellem Nachweis oder PCR zur Detektion von Bakterien basierten, wurden in der Nase von Katzen mit Katzenschnupfen am häufigsten *Pasteurella*, *Streptococcus*, und *Staphylococcus* beschrieben (SCHULZ et al., 2006), was sich mit den Ergebnissen der vorliegenden Studie deckt. Eine weitere Studie berichtet neben diesen Bakterien zusätzlich von *Mycoplasma* spp. als eines der häufigsten Bakterien in der Nase von Katzenschnupfenpatienten (VEIR et al., 2008). Die pathogene Rolle von *Mycoplasma* spp. wird derweil in der Literatur kontrovers diskutiert. Von einigen Autoren werden sie zu den Primärerregern des Katzenschnupfenkomplexes gezählt (BANNASCH & FOLEY, 2005; LITSTER et al., 2015). Diese Einschätzung wird in Frage gestellt, da *Mycoplasma* spp. auch bei klinisch gesunden Katzen isoliert wurde (FERNANDEZ et al., 2017). Auch in der Nase von respiratorisch gesunden Katzen, die allerdings anderweitig schwerwiegend erkrankt waren, konnten Mykoplasmen detektiert werden (SCHULZ et al., 2014).

Interessanterweise gehörte *Mycoplasma* in der vorliegenden Studie bei Katzen mit

Katzenschnupfen nicht zu den häufigsten Bakterientaxa und erreichte nur eine relative Häufigkeit von 0,5 %. *C. felis* stellt ein anderes, bei Katzen mit Katzenschnupfen und Konjunktivitis häufig in Konjunktivalabstrichen nachgewiesenes Pathogen dar (JOHNSON, 1984; IWAMOTO et al., 2001; CAI et al., 2002; HELPS et al., 2003; FERNANDEZ et al., 2017). In vorangegangenen Studien wurde dieser Erreger aber auch in der Nase von Katzen mit FURTD beobachtet (JOHNSON, 1984; IWAMOTO et al., 2001; CAI et al., 2002; SCHULZ et al., 2015). Bezeichnenderweise wurde *C. felis* in der vorliegenden Studie nur bei Patienten mit Katzenschnupfen festgestellt (relative Häufigkeit 5,7 %), jedoch weder bei gesunden Katzen noch bei Neoplasiepatienten, was die pathogene Rolle des Erregers unterstreicht.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass *Pasteurella* spp. vor allem in der Nase von Katzen mit Nasentumor oder Katzenschnupfen, aber auch bei gesunden Katzen aufzufinden sind. Bei Katzen mit Katzenschnupfen wurde das Vorkommen von *Pasteurella* spp. in der Nase bereits kulturell nachgewiesen (SCHULZ et al., 2006; VEIR et al., 2008). Im Rahmen anderer Mikrobiomstudien wurde der Nachweis von *Pasteurella* spp. mit feliner Gingivostomatitis assoziiert (DOLIESLAGER et al., 2011), und das Bakterium konnte aus Wunden, die durch Katzenbisse hervorgerufen wurden, isoliert werden (GOLDSTEIN et al., 2012). In einem Fallbericht über einen Papagei (*Anodorhynchus hyacinthinus*) mit nasalem Adenokarzinom wurde *Pasteurella* spp. aus dessen Nasenausfluss isoliert (NOONAN et al., 2014).

Die vorliegende Studie wird durch einige Faktoren limitiert. Die Analyse kann von verschiedenen Faktoren beeinflusst oder auch beeinträchtigt werden. Bereits die Vorarbeiten der eigentlichen Genomsequenzierung können die mikrobielle Beurteilung signifikant beeinflussen. So hat die DNA von Chemikalien und Verbrauchsmaterialien wie DNA-Extraktionskits (MOHAMMADI et al., 2005; SALTER et al., 2014), PCR-Reagenzien (TANNER et al., 1998; CORLESS et al., 2000), oder auch die Wahl der Extraktionsmöglichkeit (BIESBROEK et al., 2012) und Unterschiede in der Effektivität der PCR (BRANDT et al., 2012) das Potential, die Ergebnisse zu beeinträchtigen. Kontaminierende DNA stellt insbesondere bei Proben mit geringer mikrobieller Biomasse ein häufiges und ernsthaftes Problem dar. Die geringe Menge an Ausgangsmaterial kann so effektiv verdrängt werden, was zu verfälschten Ergebnissen führt. Aus diesem Grund werden

Negativkontrollen durchgeführt (SALTER et al., 2014). Im Rahmen der vorliegenden Studie musste keine Probe aufgrund mangelhafter oder zu geringer DNA-Konzentration ausgeschlossen werden. In der vorliegenden Arbeit wurden parallel zu den Proben zwei Negativkontrollen untersucht. Eine Negativkontrolle beinhaltete anstatt eines beprobten Nasentupfers einen sterilen Tupfer, die andere wurde ganz ohne Tupfer durchgeführt. Die weiteren Schritte erfolgten wie bei allen anderen Proben. Beide Negativkontrollen wiesen Bakterienvorkommen auf. Eine Verunreinigung durch die Probenentnahme, die Tupfer, die DNA-Extraktion, die PCR oder die spätere Sequenzierung kann also nicht ausgeschlossen werden. Jedoch scheint ihr Einfluss gering zu sein, da sich die Negativkontrollen hinsichtlich ihrer Bakterientaxa stark von den Nasentupferproben unterschieden. So stellte beispielsweise das Genus *Phyllobacterium* 84,8 % aller nachgewiesenen Taxa bei der Negativkontrolle ohne Tupfer dar, war bei allen anderen Tupfern hingegen deutlich weniger repräsentiert. Bakterien des Genus *Delftia* machten bei der Negativkontrolle des unbenutzten Tupfers 19,0 % aller in dieser Probe nachgewiesenen Taxa aus, stellten jedoch in den anderen Proben nur einen sehr geringen prozentualen Anteil an allen nachgewiesenen Bakterien dar. Selbiges gilt für *Pseudomonas*, die in der Negativkontrolle des Tupfers ohne Probenmaterial mit 22,5 % deutlich häufiger repräsentiert waren als bei allen anderen Proben. Bakterientaxa, die bei Katzen eine hohe relative Häufigkeit aufwiesen, waren bei den Negativkontrollen hingegen kaum nachweisbar. Es ist somit unwahrscheinlich, dass die relative Häufigkeit der Taxa allein durch Verunreinigung zustande kommt. Auch frühere Mikrobiomstudien berichten von dem Problem der Kontamination und dem Vorhandensein von Bakterien in Negativkontrollen. *Phyllobacterium* (SALTER et al., 2014), *Delftia* (SALTER et al., 2014) und *Pseudomonas* (GRAHN et al., 2003; LAURENCE et al., 2014; SALTER et al., 2014) sind demnach als Kontaminanten hinreichend bekannt.

Mögliche Gründe für eine Verunreinigung der Negativkontrollen im Rahmen der vorliegenden Arbeit liefern die Ergebnisse anderer Studien: So gibt es Vermutungen, dass eine Kontamination der Proben nicht nur durch im Labor verwendete Reagenzien oder Wegwerfartikel aus Plastik zustande kommen kann, sondern auch durch steriles Wasser (GRAHN et al., 2003). Somit besteht bei der Aufbereitung der Proben und der darauf folgenden PCR die Möglichkeit einer Verunreinigung. Ein Nachweis dieser Hypothese bleibt aber schwierig, da

beispielsweise, um die Durchführung der PCR zu vermeiden, eine Kultur angefertigt werden müsste. Ein negatives Ergebnis der Kultur bedeutet aber nicht die Abwesenheit betreffender Bakterien und kann folglich nicht die damit verbundene Fragestellung einer möglichen Kontamination beantworten (GRAHN et al., 2003). Das Problem der Kontamination während der PCR könnte bei Verwendung der Metagenom-Shotgun-Sequenzierung umgangen werden. Jedoch können auch bei dieser Methodik während der vorherigen DNA-Extraktion Kontaminanten eingeschleust werden. Nichts desto trotz wird empfohlen, aus jeder an der Analyse beteiligten Materialien, also der an der Probensammlung beteiligten Utensilien, jedem Extraktions-Kit und jedem PCR-Kit Kontrollproben zu entnehmen und zu untersuchen, um ausfindig zu machen, zu welchem Zeitpunkt der Analyse die Kontamination zustande kam (SALTER et al., 2014). Im Rahmen dieser Studie musste keine Probe aufgrund mangelhafter oder zu geringer DNA-Konzentration verworfen werden. Eine Verzerrung der Bakterienvorkommen aufgrund einer zu geringen Bakterienkonzentration ist somit nicht gegeben. Da sich beide Negativtupfer in der relativen Häufigkeit von Bakterientaxa sehr stark von den bei Katzen detektierten Bakterien unterschieden, ist auch diesbezüglich eine Verzerrung der erhobenen Daten nicht gegeben.

Eine weitere Limitation der Studie stellt die Probensammlung der Katzen dar. Die gesunden Probanden wurden bis auf einige, die sich während einer Kastration in Allgemeinanästhesie befanden, im Wachzustand beprobt. Bei allen Katzen mit nasaler Neoplasie wurde die Beprobung unter Allgemeinanästhesie durchgeführt. Katzen mit Katzenschnupfen wurden nur im Wachzustand Tupfer in die Nase eingeführt. Die Probenentnahme gestaltete sich insbesondere bei Katzenwelpen aufgrund des kleinen Durchmessers der Nasenlöcher nicht einfach. Obwohl die Probenentnahme unter Narkose einfacher durchzuführen war, wurde bei einer nichtparametrischen statistischen Untersuchung mittels ANOSIM-Analyse (Analysis of similarities) der gesunden Studienpatienten kein Unterschied der nasalen bakteriellen Komposition zwischen wach und narkotisiert beprobten Katzen festgestellt ( $p = 0,750$ ), was auf einen geringen Einfluss durch die Narkose bei der Beprobung hinweist..

Wie bereits erläutert unterschieden sich die Gruppen bezüglich ihres Alters, was einen statistischen Vergleich der nasalen mikrobiellen Zusammensetzung zwischen verschiedenen Krankheitsgruppen ausschloss. Darüber hinaus wurden in diese

Studie relativ kleine Patientenzahlen eingeschlossen. Zudem konnte eine signifikante, individuell abhängige Variabilität des Mikrobioms festgestellt werden. Auf Grundlage der vorliegenden Analysen ein Core Mikrobiom der feline Nasenhöhle zu definieren, wäre somit verfrüht. Vielmehr bieten die Ergebnisse dieser Arbeit erste Hinweise und Denkanstöße für weitere Forschungsvorhaben. Im Rahmen zukünftiger Studien sollte eine größere Anzahl an gesunden und kranken Katzen unter Berücksichtigung der Altersabhängigkeit untersucht werden, um weitere Puzzleteile, die zur Definition des feline nasalen Mikrobioms führen, hinzuzufügen. Als Ausblick für die Zukunft können Kenntnisse über das Mikrobiom der Katzennase hilfreich sein, um diagnostische Tests, die auf der Detektierung von Veränderungen des Mikrobioms beruhen, zu etablieren. Würde einzelnen Krankheiten eine ihnen spezifische Veränderung der mikrobiellen Komposition zugeordnet werden können, könnte die Diagnostik eben dieser Erkrankung schnell, nicht invasiv und kostengünstig durchgeführt werden. In diesem Zusammenhang wäre zudem die Bestimmung des Metaboloms sinnvoll. Das Metabolom stellt die aktuellste Erweiterung der Mikrobiomforschung dar. Augenmerk dieser neuen Forschungsrichtung liegt auf Phänotyp und Funktion eines biologischen Systems. Die Analyse des Metaboloms ermöglicht es, Einflüsse des Mikrobioms auf den Metabolismus und somit funktionelle Veränderungen zu erfassen. Auch diese Veränderung stellt eine Möglichkeit dar, neue diagnostische Tests zur Detektion von Krankheiten zu entwickeln (SHAH et al., 2012).

Auch eine individuell auf den Patienten zugeschnittene Therapie, die auf die jeweiligen Veränderungen des Mikrobioms einwirkt, könnte den Gebrauch von Antibiotika reduzieren. Ein verminderter Gebrauch von Antibiotika würde sich positiv auf das Gesamtmikrobiom des Individuums auswirken und darüber hinaus in einem größeren Kontext gesehen ein wichtiger Schritt sein, um der schlechten Resistenzlage vieler gebräuchlicher Antibiotika entgegenzuwirken.



## V. ZUSAMMENFASSUNG

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, das nasale Mikrobiom von gesunden Katzen, Katzen mit nasaler Neoplasie und Katzen mit Katzenschnupfen mit Hilfe der Amplikon-basierten 16S-rRNA-Sequenzierung zu beschreiben. Zudem sollte der Einfluss von individuellen Einflussfaktoren und Umweltfaktoren untersucht werden.

Es konnte ein signifikanter Einfluss des Alters und der Haltungsform der Katzen auf die Bakterienzusammensetzung festgestellt werden. In allen Proben wurde sowohl eine hohe Vielfalt an Bakterienspezies als auch eine große mikrobielle Diversität nachgewiesen. Für die Parameter Einfluss der Narkose, Zusammenleben im selben Haushalt und Verwandtschaft konnte kein signifikanter Einfluss auf die Konstellation des Mikrobioms aufgezeigt werden. Bei Katzen mit nasaler Neoplasie hatte eine antibiotische Vorbehandlung keinen signifikanten Einfluss auf die mikrobielle Besiedlung der Nase. Katzen mit Katzenschnupfen hingegen zeigten bei einem positiven Nachweis von *C. felis* und FHV-1 signifikante Unterschiede des nasalen Mikrobioms gegenüber Katzen, bei denen der Nachweis selbiger Erreger negativ verlief.

Proteobakterien, Firmicutes und Bacteroidetes waren in allen drei untersuchten Gruppen die am häufigsten nachgewiesenen bakteriellen Stämme. Bei gesunden Katzen und Katzen mit Katzenschnupfen war *Moraxella* spp. der häufigste Genus, wohingegen *Bradyrhizobiaceae* der am häufigsten nachgewiesene Genus bei Katzen mit Nasentumoren war. Gemessen an der relativen Häufigkeit der Taxa wurde eine hohe individuelle Variabilität bei gesunden und kranken Katzen beobachtet.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die feline Nasenhöhle eine sehr viel variablere und diversere mikrobielle Zusammensetzung aufweist, als noch kürzlich aufgrund von kulturbasierten Methoden angenommen wurde. Die weitere Erforschung des nasalen feline Mikrobioms und von Zusammenhängen zwischen Mikrobiom und Pathogenese respiratorischer Erkrankungen bleibt zukünftigen Studien vorbehalten.

## VI. SUMMARY

The objective of this study was to examine the microbiome of healthy cats, cats with nasal neoplasia, and cats with feline upper respiratory tract disease (FURTD) using next generation sequencing techniques based on the 16S rRNA gene. Furthermore, the influence of individual and environmental factors was evaluated.

A significant influence of age and indoor/outdoor status of cats on the bacterial composition was detected. High species richness and microbial diversity were observed in all samples. Factors including anesthesia, same household or relation did not represent a significant influence on the nasal microbial composition. In cats with nasal neoplasia, there was no significant difference in the microbial composition of the nose regardless of antimicrobial pretreatment. Nasal microbiome of cats with FURTD was significantly influenced by a positive test result for *C. felis* and FHV-1 compared to cats that were tested negative for these infectious agents.

In all examined groups, the most abundant phyla identified were Proteobacteria, Firmicutes, and Bacteroidetes. In healthy cats and cats with FURTD, *Moraxella* spp. was the most common genus, while it was *Bradyrhizobiaceae* in cats with nasal neoplasia. High individual variability was observed concerning the relative abundance of taxa in healthy and diseased cats.

In summary, the study demonstrates that the nose of cats is inhabited by significantly more variable and diverse microbial communities than previously known using culture-based methods. Further investigations of the feline nasal microbiome and the correlation of microbiome and pathogenesis of respiratory diseases remain objects to future studies.

## VII. LITERATURVERZEICHNIS

Abreu NA, Nagalingam NA, Song Y, Roediger FC, Pletcher SD, Goldberg AN, Lynch SV. Sinus microbiome diversity depletion and *Corynebacterium tuberculostrictum* enrichment mediates rhinosinusitis. *Sci Transl Med* 2012; 4: 151ra24.

Achenbach-Richter L, Gupta R, Stetter KO, Woese CR. Were the original eubacteria thermophiles? *Syst Appl Microbiol* 1987; 9: 34-9.

Acinas SG, Marcelino LA, Klepac-Ceraj V, Polz MF. Divergence and redundancy of 16S rRNA sequences in genomes with multiple *rrn* operons. *J Bacteriol* 2004; 186: 2629-35.

Alho OP, Karttunen TJ, Karttunen R, Tuokko H, Koskela M, Suramo I, Uhari M. Subjects with allergic rhinitis show signs of more severely impaired paranasal sinus functioning during viral colds than nonallergic subjects. *Allergy* 2003; 58: 767-71.

Allen EK, Koeppel AF, Hendley JO, Turner SD, Winther B, Sale MM. Characterization of the nasopharyngeal microbiota in health and during rhinovirus challenge. *Microbiome* 2014; 2: 22.

Amann RI, Ludwig W, Schleifer KH. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev* 1995; 59: 143-69.

Aniansson G, Alm B, Andersson B, Larsson P, Nylen O, Peterson H, Rigner P, Svanborg M, Svanborg C. Nasopharyngeal colonization during the first year of life. *J Infect Dis* 1992; 165 Suppl 1: S38-42.

Ashelford KE, Chuzhanova NA, Fry JC, Jones AJ, Weightman AJ. At least 1 in 20 16S rRNA sequence records currently held in public repositories is estimated to contain substantial anomalies. *Appl Environ Microbiol* 2005; 71: 7724-36.

August JR. The control and eradication of feline upper respiratory infections in cluster populations. *Vet Med* 1990; 85: 1002-6.

Aurora R, Chatterjee D, Hentzleman J, Prasad G, Sindwani R, Sanford T. Contrasting the microbiomes from healthy volunteers and patients with chronic rhinosinusitis. *JAMA Otolaryngol Head Neck Surg* 2013; 139: 1328-38.

Bach JF. The effect of infections on susceptibility to autoimmune and allergic diseases. *N Engl J Med* 2002; 347: 911-20.

Backhed F, Ding H, Wang T, Hooper LV, Koh GY, Nagy A, Semenkovich CF, Gordon JI. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 15718-23.

Bakaletz LO. Developing animal models for polymicrobial diseases. *Nat Rev Microbiol* 2004; 2: 552-68.

Banay GL. An introduction to medical terminology, Greek and Latin derivations. *Bull Med Libr Assoc* 1948; 36: 1-27.

Bannasch MJ, Foley JE. Epidemiologic evaluation of multiple respiratory pathogens in cats in animal shelters. *J Feline Med Surg* 2005; 7: 109-19.

Bassiouni A, Cleland EJ, Psaltis AJ, Vreugde S, Wormald PJ. Sinonasal microbiome sampling: a comparison of techniques. *PLoS One* 2015; 10: e0123216.

Bassis CM, Tang AL, Young VB, Pynnonen MA. The nasal cavity microbiota of healthy adults. *Microbiome* 2014; 2: 27.

Bassis CM, Erb-Downward JR, Dickson RP, Freeman CM, Schmidt TM, Young VB, Beck JM, Curtis JL, Huffnagle GB. Analysis of the upper respiratory tract microbiotas as the source of the lung and gastric microbiotas in healthy individuals. *MBio* 2015; 6: e00037.

Berger A, Willi B, Meli ML, Boretti FS, Hartnack S, Dreyfus A, Lutz H, Hofmann-Lehmann R. Feline calicivirus and other respiratory pathogens in cats with Feline calicivirus-related symptoms and in clinically healthy cats in Switzerland. *BMC Vet Res* 2015; 11: 282.

Bergmann GT, Bates ST, Eilers KG, Lauber CL, Caporaso JG, Walters WA, Knight R, Fierer N. The under-recognized dominance of Verrucomicrobia in soil bacterial communities. *Soil Biol Biochem* 2011; 43: 1450-5.

Bhatt AS, Freeman SS, Herrera AF, Pedamallu CS, Gevers D, Duke F, Jung J, Michaud M, Walker BJ, Young S, Earl AM, Kostic AD, Ojesina AI, Hasserjian R, Ballen KK, Chen YB, Hobbs G, Antin JH, Soiffer RJ, Baden LR, Garrett WS, Hornick JL, Marty FM, Meyerson M. Sequence-based discovery of *Bradyrhizobium enterica* in cord colitis syndrome. *N Engl J Med* 2013; 369: 517-28.

Biesbroek G, Sanders EA, Roeselers G, Wang X, Caspers MP, Trzcinski K, Bogaert D, Keijser BJ. Deep sequencing analyses of low density microbial communities: working at the boundary of accurate microbiota detection. *PLoS One* 2012; 7: e32942.

Biesbroek G, Tsivtsivadze E, Sanders EA, Montijn R, Veenhoven RH, Keijser BJ, Bogaert D. Early respiratory microbiota composition determines bacterial succession patterns and respiratory health in children. *Am J Respir Crit Care Med* 2014a; 190: 1283-92.

Biesbroek G, Bosch AA, Wang X, Keijser BJ, Veenhoven RH, Sanders EA, Bogaert D. The impact of breastfeeding on nasopharyngeal microbial communities in infants. *Am J Respir Crit Care Med* 2014b; 190: 298-308.

Biesbroek G, Wang X, Keijser BJ, Eijkemans RM, Trzcinski K, Rots NY, Veenhoven RH, Sanders EA, Bogaert D. Seven-valent pneumococcal conjugate vaccine and nasopharyngeal microbiota in healthy children. *Emerg Infect Dis* 2014c; 20: 201-10.

Binns SH, Dawson S, Speakman AJ, Cuevas LE, Gaskell CJ, Hart CA, Morgan KL, Gaskell RM. Prevalence and risk factors for feline Bordetella bronchiseptica infection. Vet Rec 1999; 144: 575-80.

Binns SH, Dawson S, Speakman AJ, Cuevas LE, Hart CA, Gaskell CJ, Morgan KL, Gaskell RM. A study of feline upper respiratory tract disease with reference to prevalence and risk factors for infection with feline calicivirus and feline herpesvirus. J Feline Med Surg 2000; 2: 123-33.

Birzele LT, Depner M, Ege MJ, Engel M, Kublik S, Bernau C, Loss GJ, Genuneit J, Horak E, Schlöter M, Braun-Fahrlander C, Danielewicz H, Heederik D, von Mutius E, Legatzki A. Environmental and mucosal microbiota and their role in childhood asthma. Allergy 2017; 72: 109-19.

Bisgaard H, Hermansen MN, Buchvald F, Loland L, Halkjaer LB, Bonnelykke K, Brasholt M, Heltberg A, Vissing NH, Thorsen SV, Stage M, Pipper CB. Childhood asthma after bacterial colonization of the airway in neonates. N Engl J Med 2007; 357: 1487-95.

Biswas K, Hoggard M, Jain R, Taylor MW, Douglas RG. The nasal microbiota in health and disease: variation within and between subjects. Front Microbiol 2015; 9: 134.

Blaser M. Antibiotic overuse: Stop the killing of beneficial bacteria. Nature 2011; 476: 393-4.

Blaser MJ, Falkow S. What are the consequences of the disappearing human microbiota? Nat Rev Microbiol 2009; 7: 887-94.

Boase S, Foreman A, Cleland E, Tan L, Melton-Kreft R, Pant H, Hu FZ, Ehrlich GD, Wormald PJ. The microbiome of chronic rhinosinusitis: culture, molecular diagnostics and biofilm detection. BMC Infect Dis 2013; 13: 210.

Bogaert D, De Groot R, Hermans PW. *Streptococcus pneumoniae* colonisation: the key to pneumococcal disease. *Lancet Infect Dis* 2004; 4: 144-54.

Bogaert D, Keijser B, Huse S, Rossen J, Veenhoven R, van Gils E, Bruin J, Montijn R, Bonten M, Sanders E. Variability and diversity of nasopharyngeal microbiota in children: a metagenomic analysis. *PLoS One* 2011; 6: e17035.

Boyle RJ, Robins-Browne RM, Tang ML. Probiotic use in clinical practice: what are the risks? *Am J Clin Nutr* 2006; 83: 1256-64; quiz 446-7.

Brandt BW, Bonder MJ, Huse SM, Zaura E. TaxMan: a server to trim rRNA reference databases and inspect taxonomic coverage. *Nucleic Acids Res* 2012; 40: W82-7.

Britton AP, Davies JL. Rhinitis and meningitis in two shelter cats caused by *Streptococcus equi* subspecies *zooepidemicus*. *J Comp Pathol* 2010; 143: 70-4.

Brook I. The role of bacterial interference in otitis, sinusitis and tonsillitis. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2005; 133: 139-46.

Cai Y, Fukushi H, Koyasu S, Kuroda E, Yamaguchi T, Hirai K. An etiological investigation of domestic cats with conjunctivitis and upper respiratory tract disease in Japan. *J Vet Med Sci* 2002; 64: 215-9.

Cape L. Feline idiopathic chronic rhinosinusitis: A retrospective study of 30 cases. *J Am Anim Hosp Assoc* 1992; 28: 149-55.

Cash HL, Whitham CV, Behrendt CL, Hooper LV. Symbiotic bacteria direct expression of an intestinal bactericidal lectin. *Science* 2006; 313: 1126-30.

Chandler DP, Fredrickson JK, Brockman FJ. Effect of PCR template concentration on the composition and distribution of total community 16S rDNA clone libraries. *Mol Ecol* 1997; 6: 475-82.

Charlson ES, Bittinger K, Haas AR, Fitzgerald AS, Frank I, Yadav A, Bushman FD, Collman RG. Topographical continuity of bacterial populations in the healthy human respiratory tract. *Am J Respir Crit Care Med* 2011; 184: 957-63.

Chikindas ML, Novak J, Driessen AJ, Konings WN, Schilling KM, Caufield PW. Mutacin II, a bactericidal antibiotic from *Streptococcus mutans*. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39: 2656-60.

Choi CH, Poroyko V, Watanabe S, Jiang D, Lane J, deTineo M, Baroody FM, Naclerio RM, Pinto JM. Seasonal allergic rhinitis affects sinonasal microbiota. *Am J Rhinol Allergy* 2014a; 28: 281-6.

Choi EB, Hong SW, Kim DK, Jeon SG, Kim KR, Cho SH, Gho YS, Jee YK, Kim YK. Decreased diversity of nasal microbiota and their secreted extracellular vesicles in patients with chronic rhinosinusitis based on a metagenomic analysis. *Allergy* 2014b; 69: 517-26.

Claesson MJ, Wang Q, O'Sullivan O, Greene-Diniz R, Cole JR, Ross RP, O'Toole PW. Comparison of two next-generation sequencing technologies for resolving highly complex microbiota composition using tandem variable 16S rRNA gene regions. *Nucleic Acids Res* 2010; 38: e200.

Clayton TA, Lindon JC, Cloarec O, Antti H, Charuel C, Hanton G, Provost JP, Le Net JL, Baker D, Walley RJ, Everett JR, Nicholson JK. Pharmaco-metabonomic phenotyping and personalized drug treatment. *Nature* 2006; 440: 1073-7.

Cleland EJ, Drilling A, Bassiouni A, James C, Vreugde S, Wormald PJ. Probiotic manipulation of the chronic rhinosinusitis microbiome. *Int Forum Allergy Rhinol* 2014; 4: 309-14.

Cleland EJ, Bassiouni A, Vreugde S, Wormald PJ. The bacterial microbiome in chronic rhinosinusitis: Richness, diversity, postoperative changes, and patient outcomes. *Am J Rhinol Allergy* 2016; 30: 37-43.



Corless CE, Guiver M, Borrow R, Edwards-Jones V, Kaczmarski EB, Fox AJ. Contamination and sensitivity issues with a real-time universal 16S rRNA PCR. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 1747-52.

Costello EK, Lauber CL, Hamady M, Fierer N, Gordon JI, Knight R. Bacterial community variation in human body habitats across space and time. *Science* 2009; 326: 1694-7.

Coughlan K, Olsen KE, Boxrud D, Bender JB. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in resident animals of a long-term care facility. *Zoonoses Public Health* 2010; 57: 220-6.

Cremers AJ, Zomer AL, Gritsfeld JF, Ferwerda G, van Hijum SA, Ferreira DM, Shak JR, Klugman KP, Boekhorst J, Timmerman HM, de Jonge MI, Gordon SB, Hermans PW. The adult nasopharyngeal microbiome as a determinant of pneumococcal acquisition. *Microbiome* 2014; 2: 44.

Davis JA, Jackson CR, Fedorka-Cray PJ, Barrett JB, Brousse JH, Gustafson J, Kucher M. Anatomical distribution and genetic relatedness of antimicrobial-resistant *Escherichia coli* from healthy companion animals. *J Appl Microbiol* 2011; 110: 597-604.

De Groote MA, Frank DN, Dowell E, Glode MP, Pace NR. *Lactobacillus rhamnosus* GG bacteremia associated with probiotic use in a child with short gut syndrome. *Pediatr Infect Dis J* 2005; 24: 278-80.

Desai N, Antonopoulos D, Gilbert JA, Glass EM, Meyer F. From genomics to metagenomics. *Curr Opin Biotechnol* 2012; 23: 72-6.

Dethlefsen L, McFall-Ngai M, Relman DA. An ecological and evolutionary perspective on human-microbe mutualism and disease. *Nature* 2007; 449: 811-8.

Di Martino B, Di Francesco CE, Meridiani I, Marsilio F. Etiological investigation

of multiple respiratory infections in cats. *New Microbiol* 2007; 30: 455-61.

Dickey AM, Loy JD, Bono JL, Smith TP, Apley MD, Lubbers BV, DeDonder KD, Capik SF, Larson RL, White BJ, Blom J, Chitko-McKown CG, Clawson ML. Large genomic differences between *Moraxella bovoculi* isolates acquired from the eyes of cattle with infectious bovine keratoconjunctivitis versus the deep nasopharynx of asymptomatic cattle. *Vet Res* 2016; 47: 31.

Dolieslager SM, Riggio MP, Lennon A, Lappin DF, Johnston N, Taylor D, Bennett D. Identification of bacteria associated with feline chronic gingivostomatitis using culture-dependent and culture-independent methods. *Vet Microbiol* 2011; 148: 93-8.

Donia MS, Cimermancic P, Schulze CJ, Wieland Brown LC, Martin J, Mitreva M, Clardy J, Linington RG, Fischbach MA. A systematic analysis of biosynthetic gene clusters in the human microbiome reveals a common family of antibiotics. *Cell* 2014; 158: 1402-14.

Dowd SE, Sun Y, Wolcott RD, Domingo A, Carroll JA. Bacterial tag-encoded FLX amplicon pyrosequencing (bTEFAP) for microbiome studies: bacterial diversity in the ileum of newly weaned *Salmonella*-infected pigs. *Foodborne Pathog Dis* 2008; 5: 459-72.

Drancourt M, Bollet C, Carlioz A, Martelin R, Gayral JP, Raoult D. 16S ribosomal DNA sequence analysis of a large collection of environmental and clinical unidentifiable bacterial isolates. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 3623-30.

Ege MJ, Mayer M, Normand AC, Genuneit J, Cookson WO, Braun-Fahrlander C, Heederik D, Piarroux R, von Mutius E. Exposure to environmental microorganisms and childhood asthma. *N Engl J Med* 2011; 364: 701-9.

Faden H, Waz MJ, Bernstein JM, Brodsky L, Stanievich J, Ogra PL. Nasopharyngeal flora in the first three years of life in normal and otitis-prone children. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1991; 100: 612-5.

Faden H, Duffy L, Wasielewski R, Wolf J, Krystofik D, Tung Y. Relationship between nasopharyngeal colonization and the development of otitis media in children. Tonawanda/Williamsville Pediatrics. J Infect Dis 1997; 175: 1440-5.

Farrelly V, Rainey FA, Stackebrandt E. Effect of genome size and rrn gene copy number on PCR amplification of 16S rRNA genes from a mixture of bacterial species. Appl Environ Microbiol 1995; 61: 2798-801.

Faust K, Sathirapongsasuti JF, Izard J, Segata N, Gevers D, Raes J, Huttenhower C. Microbial co-occurrence relationships in the human microbiome. PLoS Comput Biol 2012; 8: e1002606.

Feazel LM, Robertson CE, Ramakrishnan VR, Frank DN. Microbiome complexity and Staphylococcus aureus in chronic rhinosinusitis. Laryngoscope 2012; 122: 467-72.

Feldman C, Anderson R. Cigarette smoking and mechanisms of susceptibility to infections of the respiratory tract and other organ systems. J Infect 2013; 67: 169-84.

Fernandez M, Manzanilla EG, Lloret A, Leon M, Thibault JC. Prevalence of feline herpesvirus-1, feline calicivirus, Chlamydophila felis and Mycoplasma felis DNA and associated risk factors in cats in Spain with upper respiratory tract disease, conjunctivitis and/or gingivostomatitis. J Feline Med Surg 2017; 19: 461-9.

Flint HJ, Scott KP, Louis P, Duncan SH. The role of the gut microbiota in nutrition and health. Nat Rev Gastroenterol Hepatol 2012; 9: 577-89.

Fokkens WJ, Lund VJ, Mullol J, Bachert C, Alobid I, Baroody F, Cohen N, Cervin A, Douglas R, Gevaert P, Georgalas C, Goossens H, Harvey R, Hellings P, Hopkins C, Jones N, Joos G, Kalogjera L, Kern B, Kowalski M, Price D, Riechelmann H, Schlosser R, Senior B, Thomas M, Toskala E, Voegels R, Wang de Y, Wormald PJ. European Position Paper on Rhinosinusitis and Nasal Polyps 2012. Rhinol Suppl 2012: 1-298.

Folsgaard NV, Schjorring S, Chawes BL, Rasmussen MA, Krogfelt KA, Brix S, Bisgaard H. Pathogenic bacteria colonizing the airways in asymptomatic neonates stimulates topical inflammatory mediator release. *Am J Respir Crit Care Med* 2013; 187: 589-95.

Galler A, Shibly S, Bilek A, Hirt R. [Chronic diseases of the nose and nasal sinuses in cats: a retrospective study]. *Schweiz Arch Tierheilkd* 2012; 154: 209-16.

Garbal M, Adaszek L, Lyp P, Frymus J, Winiarczyk M, Winiarczyk S. Occurrence of *Bordetella bronchiseptica* in domestic cats with upper respiratory tract infections. *Pol J Vet Sci* 2016; 19: 353-8.

Garcia-Rodriguez JA, Fresnadillo Martinez MJ. Dynamics of nasopharyngeal colonization by potential respiratory pathogens. *J Antimicrob Chemother* 2002; 50 Suppl S2: 59-73.

Gaskell RM, Radford, A.D. and Dawson, S. (2004) *Feline Infectious Respiratory Disease*, Third Edition edn. Blackwell Publishing Ltd, Oxford, UK

Geurkink N. Nasal anatomy, physiology, and function. *J Allergy Clin Immunol* 1983; 72: 123-8.

Giancola SE, Nguyen AT, Le B, Ahmed O, Higgins C, Sizemore JA, Orwig KW. Clinical utility of a nasal swab methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* polymerase chain reaction test in intensive and intermediate care unit patients with pneumonia. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2016; 86: 307-10.

Gibbons SM. The Built Environment Is a Microbial Wasteland. *mSystems* 2016; 1

Gluck U, Gebbers JO. Ingested probiotics reduce nasal colonization with pathogenic bacteria (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, and beta-hemolytic streptococci). *Am J Clin Nutr* 2003; 77: 517-20.

Goldstein EJ, Citron DM, Merriam CV, Tyrrell KL. Ceftaroline versus isolates from animal bite wounds: comparative in vitro activities against 243 isolates, including 156 *Pasteurella* species isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; 56: 6319-23.

Gorkiewicz G, Trajanoski S, Hogenauer C. *Bradyrhizobium enterica* in cord colitis syndrome. *N Engl J Med* 2013; 369: 1866-7.

Gourkow N, Lawson JH, Hamon SC, Phillips CJ. Descriptive epidemiology of upper respiratory disease and associated risk factors in cats in an animal shelter in coastal western Canada. *Can Vet J* 2013; 54: 132-8.

Gourkow N, Phillips CJ. Effect of interactions with humans on behaviour, mucosal immunity and upper respiratory disease of shelter cats rated as contented on arrival. *Prev Vet Med* 2015; 121: 288-96.

Grahn N, Olofsson M, Ellnebo-Svedlund K, Monstein HJ, Jonasson J. Identification of mixed bacterial DNA contamination in broad-range PCR amplification of 16S rDNA V1 and V3 variable regions by pyrosequencing of cloned amplicons. *FEMS Microbiol Lett* 2003; 219: 87-91.

Greenblum S, Turnbaugh PJ, Borenstein E. Metagenomic systems biology of the human gut microbiome reveals topological shifts associated with obesity and inflammatory bowel disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012; 109: 594-9.

Grice EA, Segre JA. The human microbiome: our second genome. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2012; 13: 151-70.

Grimm V, Riedel CU. Manipulation of the Microbiota Using Probiotics. *Adv Exp Med Biol* 2016; 902: 109-17.

Guillemard E, Tondou F, Lacoïn F, Schrezenmeir J. Consumption of a fermented dairy product containing the probiotic *Lactobacillus casei* DN-114001 reduces the

duration of respiratory infections in the elderly in a randomised controlled trial. *Br J Nutr* 2010; 103: 58-68.

Hao Q, Lu Z, Dong BR, Huang CQ, Wu T. Probiotics for preventing acute upper respiratory tract infections. *Cochrane Database Syst Rev* 2011: Cd006895.

Harbour DA, Howard PE, Gaskell RM. Isolation of feline calicivirus and feline herpesvirus from domestic cats 1980 to 1989. *Vet Rec* 1991; 128: 77-80.

Hariharan H, Matthew V, Fountain J, Snell A, Doherty D, King B, Shemer E, Oliveira S, Sharma RN. Aerobic bacteria from mucous membranes, ear canals, and skin wounds of feral cats in Grenada, and the antimicrobial drug susceptibility of major isolates. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2011; 34: 129-34.

Harris S, Croft J, O'Flynn C, Deusch O, Colyer A, Allsopp J, Milella L, Davis IJ. A Pyrosequencing Investigation of Differences in the Feline Subgingival Microbiota in Health, Gingivitis and Mild Periodontitis. *PLoS One* 2015; 10: e0136986.

Hasegawa K, Camargo CA, Jr. Airway microbiota and acute respiratory infection in children. *Expert Rev Clin Immunol* 2015; 11: 789-92.

Hatakka K, Blomgren K, Pohjavuori S, Kaijalainen T, Poussa T, Leinonen M, Korpela R, Pitkaranta A. Treatment of acute otitis media with probiotics in otitis-prone children-a double-blind, placebo-controlled randomised study. *Clin Nutr* 2007; 26: 314-21.

Hauser LJ, Ir D, Kingdom TT, Robertson CE, Frank DN, Ramakrishnan VR. Investigation of bacterial repopulation after sinus surgery and perioperative antibiotics. *Int Forum Allergy Rhinol* 2016; 6: 34-40.

Head IM, Saunders JR, Pickup RW. Microbial Evolution, Diversity, and Ecology: A Decade of Ribosomal RNA Analysis of Uncultivated Microorganisms. *Microb*

Ecol 1998; 35: 1-21.

Helps C, Reeves N, Egan K, Howard P, Harbour D. Detection of *Chlamydophila felis* and feline herpesvirus by multiplex real-time PCR analysis. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 2734-6.

Helps CR, Lait P, Damhuis A, Bjornehammar U, Bolta D, Brovida C, Chabanne L, Egberink H, Ferrand G, Fontbonne A, Pennisi MG, Gruffydd-Jones T, Gunn-Moore D, Hartmann K, Lutz H, Malandain E, Mostl K, Stengel C, Harbour DA, Graat EA. Factors associated with upper respiratory tract disease caused by feline herpesvirus, feline calicivirus, *Chlamydophila felis* and *Bordetella bronchiseptica* in cats: experience from 218 European catteries. *Vet Rec* 2005; 156: 669-73.

Henderson SM, Bradley K, Day MJ, Tasker S, Caney SM, Hotston Moore A, Gruffydd-Jones TJ. Investigation of nasal disease in the cat--a retrospective study of 77 cases. *J Feline Med Surg* 2004; 6: 245-57.

Hilty M, Qi W, Brugger SD, Frei L, Agyeman P, Frey PM, Aebi S, Muhlemann K. Nasopharyngeal microbiota in infants with acute otitis media. *J Infect Dis* 2012; 205: 1048-55.

Hirsch AG, Pollak J, Glass TA, Poulsen MN, Bailey-Davis L, Mowery J, Schwartz BS. Early-life antibiotic use and subsequent diagnosis of food allergy and allergic diseases. *Clin Exp Allergy* 2016;

Hojdak I, Snovak N, Abdovic S, Szajewska H, Misak Z, Kolacek S. *Lactobacillus GG* in the prevention of gastrointestinal and respiratory tract infections in children who attend day care centers: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Clin Nutr* 2010a; 29: 312-6.

Hojdak I, Abdovic S, Szajewska H, Milosevic M, Krznaric Z, Kolacek S. *Lactobacillus GG* in the prevention of nosocomial gastrointestinal and respiratory tract infections. *Pediatrics* 2010b; 125: e1171-7.

Holst BS, Hanas S, Berndtsson LT, Hansson I, Soderlund R, Aspan A, Sjudahl-Essen T, Bolske G, Greko C. Infectious causes for feline upper respiratory tract disease--a case-control study. *J Feline Med Surg* 2010; 12: 783-9.

Hu Y, Yang X, Qin J, Lu N, Cheng G, Wu N, Pan Y, Li J, Zhu L, Wang X, Meng Z, Zhao F, Liu D, Ma J, Qin N, Xiang C, Xiao Y, Li L, Yang H, Wang J, Yang R, Gao GF, Wang J, Zhu B. Metagenome-wide analysis of antibiotic resistance genes in a large cohort of human gut microbiota. *Nat Commun* 2013; 4: 2151.

Hugenholtz P, Goebel BM, Pace NR. Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *J Bacteriol* 1998; 180: 4765-74.

Human Microbiome Project Consortium. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature* 2012; 486: 207-14.

Iwamoto K, Masubuchi K, Nosaka H, Kokubu T, Nishida K, Toshida T, Yamanaka M. Isolation of chlamydia psittaci from domestic cats with oculonasal discharge in Japan. *J Vet Med Sci* 2001; 63: 937-8.

Jervis Bardy J, Psaltis AJ. Next Generation Sequencing and the Microbiome of Chronic Rhinosinusitis: A Primer for Clinicians and Review of Current Research, Its Limitations, and Future Directions. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2016; 125: 613-21.

Johnson CL, Versalovic J. The human microbiome and its potential importance to pediatrics. *Pediatrics* 2012; 129: 950-60.

Johnson FW. Isolation of Chlamydia psittaci from nasal and conjunctival exudate of a domestic cat. *Vet Rec* 1984; 114: 342-4.

Johnson LR, Drazenovich NL, Foley JE. A comparison of routine culture with polymerase chain reaction technology for the detection of Mycoplasma species in feline nasal samples. *J Vet Diagn Invest* 2004; 16: 347-51.



Johnson LR, Foley JE, De Cock HE, Clarke HE, Maggs DJ. Assessment of infectious organisms associated with chronic rhinosinusitis in cats. *J Am Vet Med Assoc* 2005; 227: 579-85.

Johnson LR, Kass PH. Effect of sample collection methodology on nasal culture results in cats. *J Feline Med Surg* 2009; 11: 645-9.

Kamada N, Nunez G. Regulation of the immune system by the resident intestinal bacteria. *Gastroenterology* 2014; 146: 1477-88.

Kanehisa M, Goto S, Sato Y, Kawashima M, Furumichi M, Tanabe M. Data, information, knowledge and principle: back to metabolism in KEGG. *Nucleic Acids Res* 2014; 42: D199-205.

Kaspar U, Kriegeskorte A, Schubert T, Peters G, Rudack C, Pieper DH, Wos-Oxley M, Becker K. The culturome of the human nose habitats reveals individual bacterial fingerprint patterns. *Environ Microbiol* 2016; 18: 2130-42.

Khalsa J, Duffy LC, Riscuta G, Starke-Reed P, Hubbard VS. Omics for Understanding the Gut-Liver-Microbiome Axis and Precision Medicine. *Clin Pharmacol Drug Dev* 2017; 6: 176-85.

Kil DY, Swanson KS. Companion animals symposium: role of microbes in canine and feline health. *J Anim Sci* 2011; 89: 1498-505.

Kim M, Morrison M, Yu Z. Evaluation of different partial 16S rRNA gene sequence regions for phylogenetic analysis of microbiomes. *J Microbiol Methods* 2011; 84: 81-7.

Kim RJ, Biswas K, Hoggard M, Taylor MW, Douglas RG. Paired analysis of the microbiota of surface mucus and whole-tissue specimens in patients with chronic rhinosinusitis. *Int Forum Allergy Rhinol* 2015; 5: 877-83.

Kizilova AK, Kravchenko IK. Diversity of diazotrophic gut inhabitants of pikas (Ochotonidae) revealed by PCR-DGGE analysis. *Mikrobiologiya* 2014; 83: 366-74.

Klappenbach JA, Saxman PR, Cole JR, Schmidt TM. rrndb: the Ribosomal RNA Operon Copy Number Database. *Nucleic Acids Res* 2001; 29: 181-4.

Klindworth A, Pruesse E, Schweer T, Peplies J, Quast C, Horn M, Glockner FO. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Res* 2013; 41: e1.

Kommineni S, Bretl DJ, Lam V, Chakraborty R, Hayward M, Simpson P, Cao Y, Bousounis P, Kristich CJ, Salzman NH. Bacteriocin production augments niche competition by enterococci in the mammalian gastrointestinal tract. *Nature* 2015; 526: 719-22.

Korten I, Mika M, Klenja S, Kieninger E, Mack I, Barbani MT, Gorgievski M, Frey U, Hilty M, Latzin P. Interactions of Respiratory Viruses and the Nasal Microbiota during the First Year of Life in Healthy Infants. *mSphere* 2016; 1

Kunin V, Engelbrektson A, Ochman H, Hugenholtz P. Wrinkles in the rare biosphere: pyrosequencing errors can lead to artificial inflation of diversity estimates. *Environ Microbiol* 2010; 12: 118-23.

Land MH, Rouster-Stevens K, Woods CR, Cannon ML, Cnota J, Shetty AK. *Lactobacillus* sepsis associated with probiotic therapy. *Pediatrics* 2005; 115: 178-81.

Lane DJ (1991) 16S/23S rRNA sequencing. J. Wiley and Sons, Chichester

Larsen JM, Steen-Jensen DB, Laursen JM, Sondergaard JN, Musavian HS, Butt TM, Brix S. Divergent pro-inflammatory profile of human dendritic cells in response to commensal and pathogenic bacteria associated with the airway microbiota. *PLoS One* 2012; 7: e31976.

Laufer AS, Metlay JP, Gent JF, Fennie KP, Kong Y, Pettigrew MM. Microbial communities of the upper respiratory tract and otitis media in children. *MBio* 2011; 2: e00245-10.

Laurence M, Hatzis C, Brash DE. Common contaminants in next-generation sequencing that hinder discovery of low-abundance microbes. *PLoS One* 2014; 9: e97876.

Lax S, Smith DP, Hampton-Marcell J, Owens SM, Handley KM, Scott NM, Gibbons SM, Larsen P, Shogan BD, Weiss S, Metcalf JL, Ursell LK, Vazquez-Baeza Y, Van Treuren W, Hasan NA, Gibson MK, Colwell R, Dantas G, Knight R, Gilbert JA. Longitudinal analysis of microbial interaction between humans and the indoor environment. *Science* 2014; 345: 1048-52.

Lederberg J, McCray AT. 'Ome Sweet 'Omics - A Genealogical Treasury of Words. *The Scientist* 2001; 15: 8.

Lemon KP, Armitage GC, Relman DA, Fischbach MA. Microbiota-targeted therapies: an ecological perspective. *Sci Transl Med* 2012; 4: 137rv5.

Lenoir-Wijnkoop I, Sanders ME, Cabana MD, Caglar E, Corthier G, Rayes N, Sherman PM, Timmerman HM, Vaneechoutte M, Van Loo J, Wolvers DA. Probiotic and prebiotic influence beyond the intestinal tract. *Nutr Rev* 2007; 65: 469-89.

Li K, Bihan M, Yooseph S, Methe BA. Analyses of the microbial diversity across the human microbiome. *PLoS One* 2012; 7: e32118.

Lippmann M, Yeates DB, Albert RE. Deposition, retention, and clearance of inhaled particles. *Br J Ind Med* 1980; 37: 337-62.

Litster A, Wu CC, Leutenegger CM. Detection of feline upper respiratory tract disease pathogens using a commercially available real-time PCR test. *Vet J* 2015;

206: 149-53.

Liu CM, Shun CT, Song HC, Lee SY, Hsu MM, How SW. Investigation into allergic response in patients with chronic sinusitis. *J Formos Med Assoc* 1992; 91: 252-7.

Liu CM, Soldanova K, Nordstrom L, Dwan MG, Moss OL, Contente-Cuomo TL, Keim P, Price LB, Lane AP. Medical therapy reduces microbiota diversity and evenness in surgically recalcitrant chronic rhinosinusitis. *Int Forum Allergy Rhinol* 2013a; 3: 775-81.

Liu CM, Kohanski MA, Mendiola M, Soldanova K, Dwan MG, Lester R, Nordstrom L, Price LB, Lane AP. Impact of saline irrigation and topical corticosteroids on the postsurgical sinonasal microbiota. *Int Forum Allergy Rhinol* 2015; 5: 185-90.

Liu H, Wang H, Huang M, Mei Y, Gu B, Wu R, Huang Y, Chen Y, Xu Y, Wang T. Analysis of antimicrobial resistance and class 1 integrons among strains from upper respiratory tract of healthy adults. *J Thorac Dis* 2013b; 5: 149-55.

Lo SC, Hung GC, Li B, Lei H, Li T, Nagamine K, Zhang J, Tsai S, Bryant R. Isolation of novel *Afipia* septicemium and identification of previously unknown bacteria *Bradyrhizobium* sp. OHSU\_III from blood of patients with poorly defined illnesses. *PLoS One* 2013; 8: e76142.

Lo SC, Hung GC, Li B, Lei H, Li T, Nagamine K, Tsai S, Zucker MJ, Olesnicky L. Mixed group of Rhizobiales microbes in lung and blood of a patient with fatal pulmonary illness. *Int J Clin Exp Pathol* 2015; 8: 13834-52.

Luoto R, Ruuskanen O, Waris M, Kalliomaki M, Salminen S, Isolauri E. Prebiotic and probiotic supplementation prevents rhinovirus infections in preterm infants: a randomized, placebo-controlled trial. *J Allergy Clin Immunol* 2014; 133: 405-13.

Macpherson AJ, Gatto D, Sainsbury E, Harriman GR, Hengartner H, Zinkernagel RM. A primitive T cell-independent mechanism of intestinal mucosal IgA responses to commensal bacteria. *Science* 2000; 288: 2222-6.

Manzoni P, Rizzollo S, Decembrino L, Ruffinazzi G, Rossi Ricci A, Gallo E, Stolfi I, Mostert M, Stronati M, Farina D. Recent advances in prevention of sepsis in the premature neonates in NICU. *Early Hum Dev* 2011; 87 Suppl 1: S31-3.

Martensson A, Greiff L, Lamei SS, Lindstedt M, Olofsson TC, Vasquez A, Cervin A. Effects of a honeybee lactic acid bacterial microbiome on human nasal symptoms, commensals, and biomarkers. *Int Forum Allergy Rhinol* 2016;

Matsuwaki Y, Wada K, Moriyama H, Kita H. Human eosinophil innate response to *Alternaria* fungus through protease-activated receptor-2. *Int Arch Allergy Immunol* 2011; 155 Suppl 1: 123-8.

Maxfield AZ, Korkmaz H, Gregorio LL, Busaba NY, Gray ST, Holbrook EH, Guo R, Bleier BS. General antibiotic exposure is associated with increased risk of developing chronic rhinosinusitis. *Laryngoscope* 2016;

McArdle HC, Dawson S, Coutts AJ, Bennett M, Hart CA, Ryvar R, Gaskell RM. Seroprevalence and isolation rate of *Bordetella bronchiseptica* in cats in the UK. *Vet Rec* 1994; 135: 506-7.

McDonald M, Willett BJ, Jarrett O, Addie DD. A comparison of DNA amplification, isolation and serology for the detection of *Chlamydia psittaci* infection in cats. *Vet Rec* 1998; 143: 97-101.

McDonald R, Zhang F, Watts JE, Schreier HJ. Nitrogenase diversity and activity in the gastrointestinal tract of the wood-eating catfish *Panaque nigrolineatus*. *Isme j* 2015; 9: 2712-24.

McHardy AC, Martin HG, Tsirigos A, Hugenholtz P, Rigoutsos I. Accurate

phylogenetic classification of variable-length DNA fragments. *Nat Methods* 2007; 4: 63-72.

McManus CM, Levy JK, Andersen LA, McGorray SP, Leutenegger CM, Gray LK, Hilligas J, Tucker SJ. Prevalence of upper respiratory pathogens in four management models for unowned cats in the Southeast United States. *Vet J* 2014; 201: 196-201.

Merkley MA, Bice TC, Grier A, Strohl AM, Man LX, Gill SR. The effect of antibiotics on the microbiome in acute exacerbations of chronic rhinosinusitis. *Int Forum Allergy Rhinol* 2015; 5: 884-93.

Metzker ML. Sequencing technologies - the next generation. *Nat Rev Genet* 2010; 11: 31-46.

Mignard S, Flandrois JP. 16S rRNA sequencing in routine bacterial identification: a 30-month experiment. *J Microbiol Methods* 2006; 67: 574-81.

Mika M, Mack I, Korten I, Qi W, Aebi S, Frey U, Latzin P, Hilty M. Dynamics of the nasal microbiota in infancy: A prospective cohort study. *J Allergy Clin Immunol* 2015; 135: 905-12 e11.

Mizgerd JP. The infant nose. Introducing the respiratory tract to the world. *Am J Respir Crit Care Med* 2014; 190: 1206-7.

Mohammadi T, Reesink HW, Vandenbroucke-Grauls CM, Savelkoul PH. Removal of contaminating DNA from commercial nucleic acid extraction kit reagents. *J Microbiol Methods* 2005; 61: 285-8.

Munier AL, de Lastours V, Barbier F, Chau F, Fantin B, Ruimy R. Comparative dynamics of the emergence of fluoroquinolone resistance in staphylococci from the nasal microbiota of patients treated with fluoroquinolones according to their environment. *Int J Antimicrob Agents* 2015; 46: 653-9.

Naidu AS, Bidlack WR, Clemens RA. Probiotic spectra of lactic acid bacteria (LAB). *Crit Rev Food Sci Nutr* 1999; 39: 13-126.

Noonan BP, de Matos R, Butler BP, Southard TL, Morrissey JK. Nasal adenocarcinoma and secondary chronic sinusitis in a hyacinth macaw (*Anodorhynchus hyacinthinus*). *J Avian Med Surg* 2014; 28: 143-50.

Ouwehand AC, Nermes M, Collado MC, Rautonen N, Salminen S, Isolauri E. Specific probiotics alleviate allergic rhinitis during the birch pollen season. *World J Gastroenterol* 2009; 15: 3261-8.

Ouwehand AC, Forssten S, Hibberd AA, Lyra A, Stahl B. Probiotic approach to prevent antibiotic resistance. *Ann Med* 2016; 48: 246-55.

Pallen MJ. Diagnostic metagenomics: potential applications to bacterial, viral and parasitic infections. *Parasitology* 2014; 141: 1856-62.

Panda S, El khader I, Casellas F, López Vivancos J, García Cors M, Santiago A, Cuenca S, Guarner F, Manichanh C. Short-Term Effect of Antibiotics on Human Gut Microbiota. *PLoS ONE* 2014; 9: e95476.

Patel JB. 16S rRNA gene sequencing for bacterial pathogen identification in the clinical laboratory. *Mol Diagn* 2001; 6: 313-21.

Pedersen NC, Sato R, Foley JE, Poland AM. Common virus infections in cats, before and after being placed in shelters, with emphasis on feline enteric coronavirus. *J Feline Med Surg* 2004; 6: 83-8.

Perret X, Staehelin C, Broughton WJ. Molecular basis of symbiotic promiscuity. *Microbiol Mol Biol Rev* 2000; 64: 180-201.

Peterson J, Garges S, Giovanni M, McInnes P, Wang L, Schloss JA, Bonazzi V, McEwen JE, Wetterstrand KA, Deal C, Baker CC, Di Francesco V, Howcroft TK,

Karp RW, Lunsford RD, Wellington CR, Belachew T, Wright M, Giblin C, David H, Mills M, Salomon R, Mullins C, Akolkar B, Begg L, Davis C, Grandison L, Humble M, Khalsa J, Little AR, Peavy H, Pontzer C, Portnoy M, Sayre MH, Starke-Reed P, Zakhari S, Read J, Watson B, Guyer M. The NIH Human Microbiome Project. *Genome Res* 2009; 19: 2317-23.

Peterson SW, Knox NC, Golding GR, Tyler SD, Tyler AD, Mabon P, Embree JE, Fleming F, Fanella S, Van Domselaar G, Mulvey MR, Graham MR. A Study of the Infant Nasal Microbiome Development over the First Year of Life and in Relation to Their Primary Adult Caregivers Using cpn60 Universal Target (UT) as a Phylogenetic Marker. *PLoS One* 2016; 11: e0152493.

Pettigrew MM, Laufer AS, Gent JF, Kong Y, Fennie KP, Metlay JP. Upper respiratory tract microbial communities, acute otitis media pathogens, and antibiotic use in healthy and sick children. *Appl Environ Microbiol* 2012; 78: 6262-70.

Pinto-Tomas AA, Sittenfeld A, Uribe-Lorio L, Chavarria F, Mora M, Janzen DH, Goodman RM, Simon HM. Comparison of midgut bacterial diversity in tropical caterpillars (Lepidoptera: Saturniidae) fed on different diets. *Environ Entomol* 2011; 40: 1111-22.

Pothoulakis C, Kelly CP, Joshi MA, Gao N, O'Keane CJ, Castagliuolo I, Lamont JT. *Saccharomyces boulardii* inhibits *Clostridium difficile* toxin A binding and enterotoxicity in rat ileum. *Gastroenterology* 1993; 104: 1108-15.

Pugh GW, Jr., McDonald TJ. Identification of bovine carriers of *Moraxella bovis* by comparative cultural examinations of ocular and nasal secretions. *Am J Vet Res* 1986; 47: 2343-5.

Qin J, Li R, Raes J, Arumugam M, Burgdorf KS, Manichanh C, Nielsen T, Pons N, Levenez F, Yamada T, Mende DR, Li J, Xu J, Li S, Li D, Cao J, Wang B, Liang H, Zheng H, Xie Y, Tap J, Lepage P, Bertalan M, Batto JM, Hansen T, Le Paslier D, Linneberg A, Nielsen HB, Pelletier E, Renault P, Sicheritz-Ponten T, Turner K, Zhu



H, Yu C, Li S, Jian M, Zhou Y, Li Y, Zhang X, Li S, Qin N, Yang H, Wang J, Brunak S, Dore J, Guarner F, Kristiansen K, Pedersen O, Parkhill J, Weissenbach J, Bork P, Ehrlich SD, Wang J. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* 2010; 464: 59-65.

Raclavsky V, Bardon J, Petruzelova J, Prochazkova P, Novotny R, Navratilova L, Zapalka M, Jakubec P, Zatloukal J, Kopriva F, Kolek V. [Prolonged culture in a humid chamber increases the yields of pathogenic bacteria from the respiratory tract samples of patients suffering from cystic fibrosis]. *Klin Mikrobiol Infekc Lek* 2016; 22: 40-2.

Ramakrishnan VR, Feazel LM, Gitomer SA, Ir D, Robertson CE, Frank DN. The microbiome of the middle meatus in healthy adults. *PLoS One* 2013; 8: e85507.

Ramakrishnan VR, Hauser LJ, Feazel LM, Ir D, Robertson CE, Frank DN. Sinus microbiota varies among chronic rhinosinusitis phenotypes and predicts surgical outcome. *J Allergy Clin Immunol* 2015; 136: 334-42.e1.

Rashid MU, Weintraub A, Nord CE. Development of antimicrobial resistance in the normal anaerobic microbiota during one year after administration of clindamycin or ciprofloxacin. *Anaerobe* 2015; 31: 72-7.

Rasmussen TT, Kirkeby LP, Poulsen K, Reinholdt J, Kilian M. Resident aerobic microbiota of the adult human nasal cavity. *APMIS* 2000; 108: 663-75.

Rautava S, Salminen S, Isolauri E. Specific probiotics in reducing the risk of acute infections in infancy--a randomised, double-blind, placebo-controlled study. *Br J Nutr* 2009; 101: 1722-6.

Revai K, Mamidi D, Chonmaitree T. Association of nasopharyngeal bacterial colonization during upper respiratory tract infection and the development of acute otitis media. *Clin Infect Dis* 2008; 46: e34-7.

Reynolds HY. Immunologic system in the respiratory tract. *Physiol Rev* 1991; 71: 1117-33.

Rio ME, Zago Beatriz L, Garcia H, Winter L. [The nutritional status change the effectiveness of a dietary supplement of lactic bacteria on the emerging of respiratory tract diseases in children]. *Arch Latinoam Nutr* 2002; 52: 29-34.

Roberfroid M. Prebiotics: the concept revisited. *J Nutr* 2007; 137: 830s-7s.

Robinson KM, Crabtree J, Mattick JS, Anderson KE, Dunning Hotopp JC. Distinguishing potential bacteria-tumor associations from contamination in a secondary data analysis of public cancer genome sequence data. *Microbiome* 2017; 5: 9.

Rutten NB, Rijkers GT, Meijssen CB, Crijns CE, Oudshoorn JH, van der Ent CK, Vlieger AM. Intestinal microbiota composition after antibiotic treatment in early life: the INCA study. *BMC Pediatr* 2015; 15: 204.

Sakwinska O, Bastic Schmid V, Berger B, Bruttin A, Keitel K, Lepage M, Moine D, Ngom Bru C, Brussow H, Gervaix A. Nasopharyngeal microbiota in healthy children and pneumonia patients. *J Clin Microbiol* 2014; 52: 1590-4.

Salk HM, Simon WL, Lambert ND, Kennedy RB, Grill DE, Kabat BF, Poland GA. Taxa of the Nasal Microbiome Are Associated with Influenza-Specific IgA Response to Live Attenuated Influenza Vaccine. *PLoS One* 2016; 11: e0162803.

Salonen A, Nikkila J, Jalanka-Tuovinen J, Immonen O, Rajilic-Stojanovic M, Kekkonen RA, Palva A, de Vos WM. Comparative analysis of fecal DNA extraction methods with phylogenetic microarray: effective recovery of bacterial and archaeal DNA using mechanical cell lysis. *J Microbiol Methods* 2010; 81: 127-34.

Salter SJ, Cox MJ, Turek EM, Calus ST, Cookson WO, Moffatt MF, Turner P,

Parkhill J, Loman NJ, Walker AW. Reagent and laboratory contamination can critically impact sequence-based microbiome analyses. *BMC Biol* 2014; 12: 87.

Savage DC. Microbial ecology of the gastrointestinal tract. *Annu Rev Microbiol* 1977; 31: 107-33.

Scadding G, Hellings P, Alobid I, Bachert C, Fokkens W, van Wijk RG, Gevaert P, Guilemany J, Kalogjera L, Lund V, Mullol J, Passalacqua G, Toskala E, van Drunen C. Diagnostic tools in Rhinology EAACI position paper. *Clin Transl Allergy* 2011; 1: 2.

Schloss PD, Westcott SL, Ryabin T, Hall JR, Hartmann M, Hollister EB, Lesniewski RA, Oakley BB, Parks DH, Robinson CJ, Sahl JW, Stres B, Thallinger GG, Van Horn DJ, Weber CF. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl Environ Microbiol* 2009; 75: 7537-41.

Schloss PD, Westcott SL. Assessing and improving methods used in operational taxonomic unit-based approaches for 16S rRNA gene sequence analysis. *Appl Environ Microbiol* 2011; 77: 3219-26.

Schloss PD, Gevers D, Westcott SL. Reducing the effects of PCR amplification and sequencing artifacts on 16S rRNA-based studies. *PLoS One* 2011; 6: e27310.

Schmidt TM, DeLong EF, Pace NR. Analysis of a marine picoplankton community by 16S rRNA gene cloning and sequencing. *J Bacteriol* 1991; 173: 4371-8.

Schulz BS, Wolf G, Hartmann K. Bacteriological and antibiotic sensitivity test results in 271 cats with respiratory tract infections. *Vet Rec* 2006; 158: 269-70.

Schulz BS, Richter P, Weber K, Mueller RS, Wess G, Zenker I, Hartmann K. Detection of feline *Mycoplasma* species in cats with feline asthma and chronic bronchitis. *J Feline Med Surg* 2014; 16: 943-9.

Schulz C, Hartmann K, Mueller RS, Helps C, Schulz BS. Sampling sites for detection of feline herpesvirus-1, feline calicivirus and Chlamydia felis in cats with feline upper respiratory tract disease. *J Feline Med Surg* 2015;

Segata N, Boernigen D, Tickle TL, Morgan XC, Garrett WS, Huttenhower C. Computational meta'omics for microbial community studies. *Mol Syst Biol* 2013; 9: 666.

Shah SH, Kraus WE, Newgard CB. Metabolomic profiling for the identification of novel biomarkers and mechanisms related to common cardiovascular diseases: form and function. *Circulation* 2012; 126: 1110-20.

Sharpton TJ. An introduction to the analysis of shotgun metagenomic data. *Front Plant Sci* 2014; 5: 209.

Sheflin AM, Whitney AK, Weir TL. Cancer-promoting effects of microbial dysbiosis. *Curr Oncol Rep* 2014; 16: 406.

Shida K, Nanno M, Nagata S. Flexible cytokine production by macrophages and T cells in response to probiotic bacteria: a possible mechanism by which probiotics exert multifunctional immune regulatory activities. *Gut Microbes* 2011; 2: 109-14.

Smith H. The role of microbial interactions in infectious disease. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1982; 297: 551-61.

Spindel ME, Veir JK, Radecki SV, Lappin MR. Evaluation of pradofloxacin for the treatment of feline rhinitis. *J Feline Med Surg* 2008; 10: 472-9.

Staley JT, Konopka A. Measurement of in situ activities of nonphotosynthetic microorganisms in aquatic and terrestrial habitats. *Annu Rev Microbiol* 1985; 39: 321-46.

Starkey MR, Nguyen DH, Kim RY, Nair PM, Brown AC, Essifie AT, Horvat JC,

Hansbro PM. Programming of the lung in early life by bacterial infections predisposes to chronic respiratory disease. *Clin Obstet Gynecol* 2013; 56: 566-76.

Stearns JC, Davidson CJ, McKeon S, Whelan FJ, Fontes ME, Schryvers AB, Bowdish DM, Kellner JD, Surette MG. Culture and molecular-based profiles show shifts in bacterial communities of the upper respiratory tract that occur with age. *Isme j* 2015; 9: 1246-59.

Steinert M, Hentschel U, Hacker J. Symbiosis and pathogenesis: evolution of the microbe-host interaction. *Naturwissenschaften* 2000; 87: 1-11.

Stephenson MF, Mfunu L, Dowd SE, Wolcott RD, Barbeau J, Poisson M, James G, Desrosiers M. Molecular characterization of the polymicrobial flora in chronic rhinosinusitis. *J Otolaryngol Head Neck Surg* 2010; 39: 182-7.

Strachan DP. Hay fever, hygiene, and household size. *Bmj* 1989; 299: 1259-60.

Sturgeon A, Pinder SL, Costa MC, Weese JS. Characterization of the oral microbiota of healthy cats using next-generation sequencing. *Vet J* 2014; 201: 223-9.

Suzuki MT, Giovannoni SJ. Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR. *Appl Environ Microbiol* 1996; 62: 625-30.

Sykes JE, Anderson GA, Studdert VP, Browning GF. Prevalence of feline *Chlamydia psittaci* and feline herpesvirus 1 in cats with upper respiratory tract disease. *J Vet Intern Med* 1999; 13: 153-62.

Sykes JE, Allen JL, Studdert VP, Browning GF. Detection of feline calicivirus, feline herpesvirus 1 and *Chlamydia psittaci* mucosal swabs by multiplex RT-PCR/PCR. *Vet Microbiol* 2001; 81: 95-108.

Tan TL, Reineke M, Ger H-J (1996) New dilution method in microtiter-plates for enumeration and enrichment of copiotrophic and oligotrophic bacteria. Schweizerbart, Stuttgart, Deutschland

Tanner MA, Goebel BM, Dojka MA, Pace NR. Specific ribosomal DNA sequences from diverse environmental settings correlate with experimental contaminants. *Appl Environ Microbiol* 1998; 64: 3110-3.

Tarabichi Y, Li K, Hu S, Nguyen C, Wang X, Elashoff D, Saira K, Frank B, Bihan M, Ghedin E, Methe BA, Deng JC. The administration of intranasal live attenuated influenza vaccine induces changes in the nasal microbiota and nasal epithelium gene expression profiles. *Microbiome* 2015; 3: 74.

Teo SM, Mok D, Pham K, Kusel M, Serralha M, Troy N, Holt BJ, Hales BJ, Walker ML, Hollams E, Bochkov YA, Grindle K, Johnston SL, Gern JE, Sly PD, Holt PG, Holt KE, Inouye M. The infant nasopharyngeal microbiome impacts severity of lower respiratory infection and risk of asthma development. *Cell Host Microbe* 2015; 17: 704-15.

Theriot CM, Young VB. Microbial and metabolic interactions between the gastrointestinal tract and *Clostridium difficile* infection. *Gut Microbes* 2014; 5: 86-95.

Thomas T, Gilbert J, Meyer F. Metagenomics - a guide from sampling to data analysis. *Microb Inform Exp* 2012; 2: 3.

Timoney JF, Gillespie JH, Scott FW, Barlough JE (1988) Hagan and Bruner's microbiology and infectious diseases of domestic animals. Cornell University Press, Ithaca, USA

Torok ME, Peacock SJ. Rapid whole-genome sequencing of bacterial pathogens in the clinical microbiology laboratory--pipe dream or reality? *J Antimicrob Chemother* 2012; 67: 2307-8.

Tringe SG, Hugenholtz P. A renaissance for the pioneering 16S rRNA gene. *Curr Opin Microbiol* 2008; 11: 442-6.

Turnbaugh PJ, Ley RE, Hamady M, Fraser-Liggett CM, Knight R, Gordon JI. The human microbiome project. *Nature* 2007; 449: 804-10.

Ungaro R, Bernstein CN, Gearry R, Hviid A, Kolho KL, Kronman MP, Shaw S, Van Kruiningen H, Colombel JF, Atreja A. Antibiotics associated with increased risk of new-onset Crohn's disease but not ulcerative colitis: a meta-analysis. *Am J Gastroenterol* 2014; 109: 1728-38.

Ursell LK, Metcalf JL, Parfrey LW, Knight R. Defining the human microbiome. *Nutr Rev* 2012; 70 Suppl 1: S38-44.

Vazquez-Baeza Y, Hyde ER, Suchodolski JS, Knight R. Dog and human inflammatory bowel disease rely on overlapping yet distinct dysbiosis networks. *Nat Microbiol* 2016; 1: 16177.

Veir JK, Ruch-Gallie R, Spindel ME, Lappin MR. Prevalence of selected infectious organisms and comparison of two anatomic sampling sites in shelter cats with upper respiratory tract disease. *J Feline Med Surg* 2008; 10: 551-7.

Veir JK, Lappin MR. Molecular diagnostic assays for infectious diseases in cats. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2010; 40: 1189-200.

Vientos-Plotts AI, Ericsson AC, Rindt H, Grobman ME, Graham A, Bishop K, Cohn LA, Reinero CR. Dynamic changes of the respiratory microbiota and its relationship to fecal and blood microbiota in healthy young cats. *PLoS One* 2017a; 12: e0173818.

Vientos-Plotts AI, Ericsson AC, Rindt H, Reinero CR. Oral Probiotics Alter Healthy Feline Respiratory Microbiota. *Front Microbiol* 2017b; 8: 1287.

Vissing NH, Chawes BL, Bisgaard H. Increased risk of pneumonia and bronchiolitis after bacterial colonization of the airways as neonates. *Am J Respir Crit Care Med* 2013; 188: 1246-52.

von Wintzingerode F, Gobel UB, Stackebrandt E. Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. *FEMS Microbiol Rev* 1997; 21: 213-29.

Vossbrinck CR, Maddox JV, Friedman S, Debrunner-Vossbrinck BA, Woese CR. Ribosomal RNA sequence suggests microsporidia are extremely ancient eukaryotes. *Nature* 1987; 326: 411-4.

Wagner M, Amann R, Lemmer H, Schleifer KH. Probing activated sludge with oligonucleotides specific for proteobacteria: inadequacy of culture-dependent methods for describing microbial community structure. *Appl Environ Microbiol* 1993; 59: 1520-5.

Wagner RD, Warner T, Roberts L, Farmer J, Balish E. Colonization of congenitally immunodeficient mice with probiotic bacteria. *Infect Immun* 1997; 65: 3345-51.

Wang WL, Xu SY, Ren ZG, Tao L, Jiang JW, Zheng SS. Application of metagenomics in the human gut microbiome. *World J Gastroenterol* 2015; 21: 803-14.

Wanke I, Steffen H, Christ C, Krismer B, Gotz F, Peschel A, Schaller M, Schittek B. Skin commensals amplify the innate immune response to pathogens by activation of distinct signaling pathways. *J Invest Dermatol* 2011; 131: 382-90.

Ward DM, Weller R, Bateson MM. 16S rRNA sequences reveal numerous uncultured microorganisms in a natural community. *Nature* 1990; 345: 63-5.

Weese SJ, Nichols J, Jalali M, Litster A. The oral and conjunctival microbiotas in cats with and without feline immunodeficiency virus infection. *Vet Res* 2015; 46:



21.

Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J Bacteriol* 1991; 173: 697-703.

Whelan FJ, Verschoor CP, Stearns JC, Rossi L, Luinstra K, Loeb M, Smieja M, Johnstone J, Surette MG, Bowdish DM. The loss of topography in the microbial communities of the upper respiratory tract in the elderly. *Ann Am Thorac Soc* 2014; 11: 513-21.

Whitehouse CA, Chase K, Embers ME, Kulesh DA, Ladner JT, Palacios GF, Minogue TD. Development of real-time PCR assays for the detection of *Moraxella macacae* associated with bloody nose syndrome in rhesus (*Macaca mulatta*) and cynomolgus (*Macaca fascicularis*) macaques. *J Med Primatol* 2015; 44: 364-72.

Whitman WB, Coleman DC, Wiebe WJ. Prokaryotes: the unseen majority. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95: 6578-83.

WHO/FAO (2002) Joint FAO/WHO Working Group Report on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. . Ed FAO/WHO, London, Ontario, Canada

Wills J, Gruffydd-Jones TJ, Richmond S, Paul ID. Isolation of *Chlamydia psittaci* from cases of conjunctivitis in a colony of cats. *Vet Rec* 1984; 114: 344-6.

Woese CR. Bacterial evolution. *Microbiol Rev* 1987; 51: 221-71.

Wu S, Tian J, Wang G, Li W, Zou H. Characterization of bacterial community in the stomach of yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*). *World J Microbiol Biotechnol* 2012; 28: 2165-74.

Yaqoob P. Ageing, immunity and influenza: a role for probiotics? *Proc Nutr Soc* 2014; 73: 309-17.

Zariwala MA, Knowles MR, Leigh MW. Primary Ciliary Dyskinesia. In: GeneReviews(R). Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH, Wallace SE, Amemiya A, Bean LJH, Bird TD, Fong CT, Mefford HC, Smith RJH, Stephens K, eds. Seattle (WA): University of Washington, Seattle 2007:

Zheng J, Ganzle MG, Lin XB, Ruan L, Sun M. Diversity and dynamics of bacteriocins from human microbiome. *Environ Microbiol* 2015; 17: 2133-43.

Zipperer A, Konnerth MC, Laux C, Berscheid A, Janek D, Weidenmaier C, Burian M, Schilling NA, Slavetinsky C, Marschal M, Willmann M, Kalbacher H, Schittek B, Brotz-Oesterhelt H, Grond S, Peschel A, Krismer B. Human commensals producing a novel antibiotic impair pathogen colonization. *Nature* 2016; 535: 511-6.

## VIII. DANKSAGUNG

Mein Dank für die Hilfe zur Umsetzung dieser Arbeit gilt an allererster Stelle meiner Doktormutter, Frau Dr. Bianka Schulz. Bei ihr möchte ich mich sehr herzlich für die freundliche und motivierende Zusammenarbeit bedanken und dafür, dass ich auf ihre uneingeschränkte und hilfreiche Unterstützung immer zählen konnte. Außerdem dafür, dass sie es mir ermöglichte, die Ergebnisse meiner Doktorarbeit auf mehreren Kongressen vorstellen zu können. Ich hätte mir keine bessere Betreuerin vorstellen können. Danke!

Ein ganz besonderer Dank gebührt Dr. Jan Suchodolski und dem gesamten GI Lab in Texas, College Station. Danke dafür, dass meine Begeisterung für dieses spannende Thema geweckt wurde und für die wunderschöne und unvergessliche Zeit in College Station. Danke an Tariq Nisar und Prajesh Ravindran für die Geduld bei der gemeinsamen Datenanalyse.

Frau Dr. Karin Weber danke ich für die Unterstützung im Labor.

Ein Dankeschön aus vollstem Herzen meiner überragenden Doktorschwester Barbara Treß, ohne deren Beistand dieser Doktorarbeit erheblich mehr Nerven zum Opfer gefallen wären.

Bei der Arbeitsgruppe für Tierzucht möchte ich mich ganz herzlich für das liebevolle Asyl bedanken, das sie mir während der Schreibphase gewährten und für ihre technische und emotionale Unterstützung. Es war eine schöne Zeit bei euch!

Ein großes Dankeschön möchte ich meinen wundervollen Freundinnen Frau Dr. Elisabeth Kunz und Frau Dr. Friederike Storch für das Korrekturlesen der Arbeit aussprechen.

Danke an alle, die bei der teils aussichtslos zu erscheinenden Rekrutierung der Patienten und der Probensammlung geholfen haben. Danke an alle Katzen, die mir so unfreiwillig und trotzdem meist freundlich ihre Nasen zur Verfügung gestellt haben.

Mein tiefer Dank gilt der Stiftung der Deutschen Wirtschaft. Ohne ihre Hilfe und finanziellen Rückhalt durch das Promotionsstipendium wäre die Umsetzung dieser Dissertation nicht möglich gewesen. Besonders bedanken möchte ich mich außerdem, dass sie mir in den letzten Jahren ermöglicht hat, meinen Horizont über die Tiermedizin hinaus zu erweitern und ich durch sie wichtige Freunde gefunden habe.

Tausend Küsse an alle meine fantastischen Freundinnen und Freunde, auf die ich in sämtlichen Lebenslagen zählen kann und denen ich so unendlich viel zu verdanken habe. Danke dafür, dass sie mich aufgebaut und mir Mut gemacht haben, wenn es nötig war. Aber auch dafür, dass sie für allerhand Schabernack zu haben sind.

Von ganzem Herzen danke ich meiner Familie inklusive Großfamilie für ihre Liebe und Unterstützung. Meinen beiden Schwestern dafür, dass sie immer zu mir halten. Schön, dass es euch gibt! Ganz besonders meinen geliebten Eltern danke ich für ihren Rückhalt, ihr Interesse und nicht zuletzt dafür, dass sie immer für mich da waren.